Aus dem Institut für Toxikologie der
Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. Remmer

SPEZIESUNTERSCHIEDE IM STOFFWECHSEL EINES PRIMÄREN ALIPHATISCHEN AMINS IN VIVO AM BEISPIEL VON CHLORPHENTERMIN

INAUGURAL–DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard - Karls - Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Ulrich Ernst Georg Köster
aus Stuttgart

1978

Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. Remmer

SPEZIESUNTERSCHIEDE IM STOFFWECHSEL EINES PRIMÄREN ALIPHATISCHEN AMINS IN VIVO AM BEISPIEL VON CHLORPHENTERMIN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Ulrich Ernst Georg Köster
aus Stuttgart

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. med. H.-J. Mallach
1. Berichterstatter: Professor Dr. med. H. Remmer
2. Berichterstatter: Professor Dr. rer. nat. W. Voelter

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Materialien und Methoden	5
2.1.	Substanzen	5
2.2.	Synthesen	5
2.2.1.	N-Azetylchlorphentermin	5
2.2.2.	N-Benzoylchlorphentermin	6
2.2.3.	N-Succinylchlorphentermin	6
2.2.4.	1-(4'-chlorphenyl)-2-methyl-2-Nitropropan	7
2.2.5.	N-Hydroxychlorphentermin	8
2.2.6.	Versuch der Synthese von N-(2"-oxopropyliden)-1-(4'-chlorphenyl)-2-amino-2-Methylpropan	10
2.3.1.	Versuchstiere	15
2.3.2.	Probanden	16
2.4.	Radioaktivitäts-Messungen	16
2.4.1.	^{14}C in wässrigen Proben	16
2.4.2.	Radiochromatographie	16
2.4.3.	Radioaktivität in Faeces	17
2.4.4.	Bestimmungen mittels Isotopenverdünnung	17
2.5.	Urinhydrolyse	18
2.5.1.	β-Glucuronidase	18
2.5.2.	Sulphatase	18
2.5.3.	Säurehydrolyse	18
2.6.	Extraktionen	19
2.6.1.	XAD-2	19
2.6.2.	Lösungsmittel - Extraktionen	19
2.7.	Chromatographische Methoden	19
2.7.1.	Papier- und Dünnschichtchromatograpie	19
2.7.2.	Detektion von Verbindungen auf Chromatogrammen	21
2.7.2.1.	BKG	21
2.7.2.2.	DMAC	21
2.7.2.3.	TTZ	21
2.7.2.4.	Stärke/KJ	21

2.7.2.5. DNPH 21
2.7.2.6. Ninhydrin 21
2.7.3. Gaschromatographie 21
2.7.4. Derivatisierung für die Gaschromatographie 23
2.7.4.1. Silylierung 23
2.7.4.2. Methylierung 23
2.7.4.3. Azetylierung 23
2.7.4.4. Trifluoroazetylierung 23
2.8. Massenspektrometrie 24
2.8.1. Gekoppelte Gaschromatographie-Niederauflösende Massenspektrometrie 24
2.8.1.1. Varian Aerograph 1700 - MAT CH5 24
2.8.1.2. Finnigan 3300/6000 24
2.8.2. Hochauflösende Massenspektrometrie 24
2.8.2.1. Die peak-matching Technik 24
2.8.2.2. AEI MS 9 24
2.9. Kernresonanzspektrometrie 24
2.10. Andere spektrometrische Methoden 25
2.10.1. Infrarot-Spektrometrie 25
2.10.2. Ultraciolett-Absorptionsspektren 25
3. Ergebnisse 26
3.1. Identifikation von Metaboliten 26
3.1.1. N-oxidierte Metaboliten 26
3.1.1.1. N-Hydroxychlorphentermin 26
3.1.1.2. 1-(4'-chlorphenyl)-2-methyl-2-Nitropropan 28
3.1.2. Charakterisierung und versuchte Identifizierung eines weiteren Metaboliten X 30
3.1.2.1. Biliäre Exkretion von X 32
3.1.2.2. Isolation von X 33
3.1.2.3. Dünnschichtchromatographie von X 34
3.1.2.4. Stabilität von X gegenüber Säure und Alkali 34
3.1.2.5. Gaschromatographie von X 35
3.1.2.6. Niederauflösende Massenspektrometrie von X 35
3.1.2.7. Hochauflösende Massenspektrometrie von X 40
3.1.2.8. Infrarot- und Ultraviolett-Spektroskopie 41

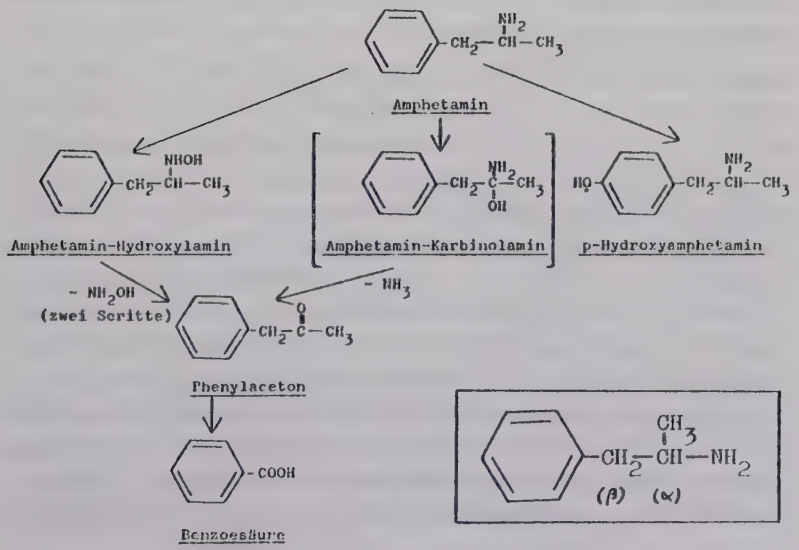
3.1.2.9.	Anorganisches Phosphat	41
3.1.2.10.	Kernresonanz-Spektrometrie	41
3.2.	Quantifizierung der Metabolite	44
3.2.1.	Unverändertes Chlorphentermin	44
3.2.2.	N-oxidierte Metabolite	45
3.2.3.	Metabolit X	46
3.3.	Metabolismus von ^{14}C-Chlorphentermin in sechs Spezies	46
3.3.1.	Metabolismus von ^{14}C-Chlorphentermin bei Ratte, Meerschweinchen und Kaninchen	46
3.3.2.	Metabolismus von ^{14}C-Chlorphentermin bei den Primaten	52
4.	Diskussion	56
4.1.	N-Oxidation	56
4.2.	Metabolit X	57
4.3.	Unverändert ausgeschiedenes Chlorphentermin und Phospholipidose	61
4.4.	Speziesunterschiede im Metabolismus eines primären aliphatischen Amins	65
5.	Zusammenfassung	66
6.	Verzeichnis der Abkürzungen	68
7.	Literaturverzeichnis	69

1. Einleitung

Die Arzneimittelsicherheit hat zunehmend an Interesse gewonnen, und die Bedeutung des Arzneimittelstoffwechsels ist dabei deutlich geworden nicht nur im Zuge des Fortschritts analytischer Methoden. Einige pharmakologisch angewandte Stoffgruppen sind bereits sehr eingehend untersucht worden; so darf der biologische Abbau von Amphetamin (1-phenyl-2-Aminopropan) und seinen Derivaten aus der Reihe der Phenyläthylamine, welche alle eine direkte oder indirekte adrenerge Wirkung aufweisen, als weitgehend geklärt gelten.

Amphetamin kann in drei Hauptrichtungen metabolisiert werden. Einmal kann der Benzolkern in para-Position hydroxyliert werden, daneben kann entweder das α-C-Atom oder der Stickstoff der aliphatischen Seitenkette angegriffen werden (Abb.1). Außerdem entsteht durch β-C-Hydroxylierung das Ephedrinanalogon, doch scheint dies ein weniger

Abbildung 1: Hauptabbauwege von Amphetamin

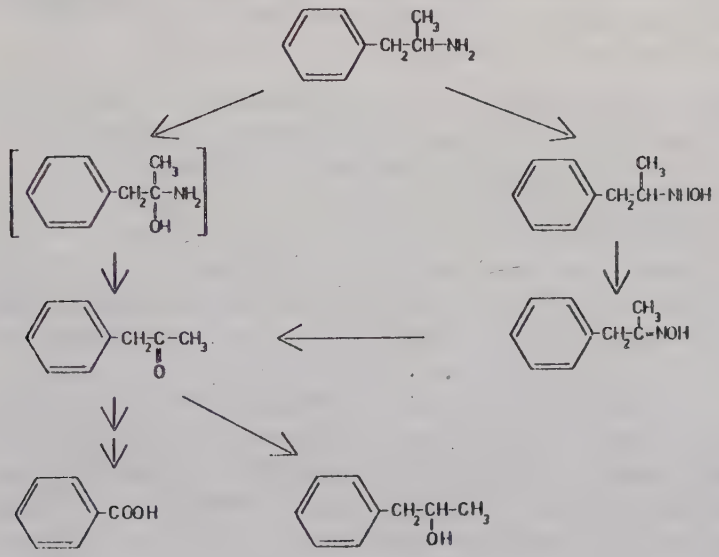


bedeutsamer Abbauweg in allen Spezies zu sein. Das Metabolitenmuster und der Konjugationstyp zeigen deutliche Unterschiede in den verschiedenen Spezies (DRING et al., 1970).

Sowohl die α-C- als auch die N-Oxidation scheinen an der oxidativen Desaminierung von Amphetamin beteiligt zu sein. Durch α-C-Hydroxylierung entsteht ein postuliertes Karbinolamin, welches unter Abspaltung von Ammoniak Phenylazeton bildet (BRODIE et al., 1958; PARLJ and MCMAHON, 1973). Hydrolyse von Phenylazeton ergibt Benzoesäure, die als Hippursäure neben dem entsprechenden sekundären Alkohol zur Ausscheidung gelangt. Das Keton mag jedoch auch aus dem Hydroxylamin hervorgehen, welches entweder über ein intermediäres N-Oxid oder aus dem Nitrosoanalogon von Amphetamin entstanden sein kann (BECKETT and BELANGER, 1974b). HUCKER und Mitarbeiter (1971) fanden das aus dem Hydroxylamin entstehende Oxim als einen bedeutenden in vivo-Metaboliten von Amphetamin; das Oxim kann leicht zum Keton hydrolysiert werden, Die verschiedenen diskutierten Stoffwechselwege sind in Abb. 2 zusammengestellt.

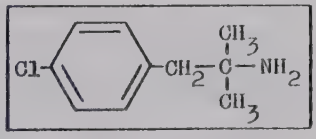
Hydroxylamine sind häufige Ausscheidungsprodukte aromatischer Amine, wenn auch mit geringem Anteil am Metabolitenmuster, und aromatische N-Oxidation ist eine weitgehend aufgeklärte Reaktion; dagegen ist wenig über die aliphatische N-Oxidation bekannt, insbesondere über deren Ausmaß und Bedeutung in vivo. In einer Übersicht zog GORROD (1973) aufgrund von erheblichen Speziesunterschieden in der N-Oxidation einige Schlüsse über die beteiligten Enzymsysteme. Er folgerte, daß der basische Stickstoff eines aliphatischen Amins durch ein Enzymsystem verschieden von der mischfunktionellen Oxidase und unter Beteiligung eines Flavoproteins oxidiert werde. Es gibt bisher jedoch keine quantitativen Untersuchungen über die N-Oxidation aliphatischer Amine am Ganztier. Mißerfolge bei der Bestimmung

Abbildung 2: Oxidative Desaminierung von Amphetamin



von Hydroxylaminen sind wahrscheinlich in deren chemischer Instabilität begründet; sie reagieren spontan und ergeben stabilere Produkte, welche ihrerseits biotransformiert werden (BECKETT et al., 1971).

Chlorphentermin (1-(4'-chlorophenyl)-2-methyl-2-Aminopropan) (CP), ein Derivat von Amphetamin, war bis 1969 in Europa als stark wirksames Anorektikum im Handel (Avicol^{R}), bis entdeckt wurde, daß die Substanz beim Menschen bei chronischer Applikation einen primären vaskulären Lungenhochdruck erzeugt (GAHL, 1970). Der pathogenetische Mechanismus wird in einem Anstieg des Serotoninspiegels der Lunge gesehen (MIELKE et al., 1973), wahrscheinlich infolge einer Hemmung der Monoaminoxidase. Die Hemmung ist ausgeprägter als nach Phentermin, aber



weniger stark als nach Aminorex-Fumarat, dem ersten Anorektikum, von dem diese schwere Nebenwirkung einer pulmonalen Hypertonie bekannt wurde (SEILER et al., 1973).

Histologisch erzeugt CP eine Phospholipidose (LÜLLMANN et al., 1973) von sehr unterschiedlicher Ausprägung und Organverteilung bei den einzelnen Tierarten (PAWARESCH et al., 1973). Für CP sind zwei der drei Hauptabbauwege des Amphetamins blockiert, und nur die Aminogruppe bleibt dem Metabolismus ausgesetzt. Offensichtlich verhindert ein größerer para-Substituent die aromatische Hydroxylierungsreaktion (BRUCE and MAYNARD,1968); die α-Methylgruppe verhindert die α-C-Oxidation und über sterische Hinderung auch die β-C-Oxidation. Auftretende N-Oxidationsprodukte werden stabilisiert werden, weil weder ein intermediäres Karbinolamin noch ein Oxim ohne Zerstörung des Kohlenstoffgerüsts des Moleküls gebildet werden kann. Deshalb kann vermutet werden, daß Speziesunterschiede in der Histopathologie der Substanz in einer unterschiedlichen Metabolisierung der Aminogruppe begründet sind, da CP als Modell eines aliphatischen Amins gelten darf.

In der vorliegenden Arbeit wurde darum der in vivo-Metabolismus von CP in sechs verschiedenen Spezies untersucht, um eine Korrelation mit der Pathologie zu unternehmen und um die quantitative Bedeutung der aliphatischen N-Oxidation in vivo abzuschätzen.

2. Materialien und Methoden

2.1. Substanzen

Chlorphentermin Hydrochlorid (CP.HCl), Schmelzpunkt 225°C war ein Geschenk von William R. Warner Ltd., Easthleigh, Hants., Großbritannien, und von H. Lundbeck & Co., Kopenhagen, Dänemark. (^{14}C)-Chlorphentermin Hydrochlorid, markiert in den α-Methylgruppen mit einer spezifischen Aktivität von 0,07 µCi/mg, Schmelzpunkt 225°C, wurde von Warner-Lambert Research Institute, Morris Plains, N.J., U.S.A. research affiliate of Warner Chilcott Laboratories, zur Verfügung gestellt. N-Hydroxychlorphentermin Oxalat(CP-NHOH) Schmelzpunkt 167°C, und 1-(4'-chlorphenyl)-2-methyl-2-Nitropropan (CP-NO_2), ein Öl, waren von Prof. A.H. Becket, Dept. of Pharmacy, Chelsea College, London, freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden und wurden zudem entsprechend der unten beschriebenen Methoden synthetisiert.

Andere Laborchemikalien hatten p.a.-Reinheitsgrad und wurden bei Bedarf zusätzlich gereinigt.

2.2. Synthesen

2.2.1. N-Azetylchlorphentermin

1g Chlorphentermin Hydrochlorid wurde in 20 ml Wasser gelöst und die freie Base aus alkalischer Lösung (2M NaOH, pH 14) mit dreimal zwei Volumina Diäthyläther extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und die freie Base als ein Öl nach Abziehen des Lösungsmittels im Rotationsverdampfer erhalten. 20 ml einer 6M Natronlauge und 5 ml Essigsäureanhydrid wurden zugegeben und die Mischung über Nacht bei Raumtemperatur gehalten; N-Azetylchlorphentermin kristallisierte dann in weißen Nadeln aus und wurde mit Wasser-Äthanol bis zum konstanten Schmelzpunkt(115°C)um

kristallisiert. Charakteristische Peaks aus dem Massenspektrum dieser Verbindung sind in Tab. 1a aufgeführt (vgl. das Massenspektrum von CP in Abb. 3). Diese bestätigen zusammen mit dem Infrarot-Spektrum die chemische Natur von N-Azetylchlorphentermin, und die Elementaranalyse ergab C: 63,8%; H:7,01%; N: 6,34% (Errechnet: C: 63,85%; H: 7,14%; N: 6,21%).

2.2.2. N-Benzoylchlorphentermin

Chlorphentermin Hydrochlorid wurde benzoyliert, wie es oben für die Azetylierung beschrieben wurde, indem anstelle von Essigsäureanhydrid 5 ml Benzoylchlorid eingesetzt wurden. Die neue Verbindung wurde durch Umkristallisieren aus Wasser-Äthanol gereinigt und hatte einen Schmelzpunkt von 121°C. Die größeren Peaks aus dem zugehörigen Massenspektrum sind in Tab. 1b aufgeführt und bestätigen zusammen mit dem Infrarotspektrum die chemische Natur des Syntheseproduktes. Die Elementaranalyse ergab C: 71,01%; H: 6,15%; N: 4,87% (Errechnet: C: 70,95%; H: 6,35%; N: 4,87%).

2.2.3. N-Succinyl-Chlorphentermin

Chlorphentermin wurde als freie Base aus Chlorphentermin Hydrochlorid (2,4g) wie zuvor dargestellt und in wasserfreiem Pyridin (40ml) aufgenommen. 1,2g Bernsteinsäureanhydrid wurden zugegeben, die Lösung 3 h lang gerührt und über Nacht bei Raumtemperatur belassen. Nachdem auf dem Rotationsverdampfer auf ein kleines Volumen (5ml) eingeengt worden war und wasserfreier Diäthyläther zugegeben wurde, präzipitierte N-Succinylchlorphentermin in weißen Kristallen. Diese wurden mit Methanol-Wasser umkristallisiert bis zum konstanten Schmelzpunkt von 156°C. Durch Titration mit 0,1M NaOH wurde ein Äquivalenzgewicht von 283 bestimmt (errechnet für $C_{14}H_{18}NO_3Cl$: 283,5), das Infrarotspektrum bestätigte die Synthese. Die Elementaranalyse ergab C: 59,06%; H: 6,32%; N: 4,83% (Errechnet :

C: 59,26%; H: 6,39%; N: 4,94%).

a) N-Azetylchlorphentermin		b) N-Benzoylchlorphentermin	
m/e	Rel. Intensität (%)	m/e	Rel. Intensität (%)
225	0.5	287	0.5
168	8.5	272	1.0
166	16.0	166	6.5
151	3.0	162	49.5
131	3.0	151	2.0
127	6.0	131	1.5
125	17.0	125	5.5
115	5.0	105	100.0
100	100.0	89	2.0
91	4.5	77	33.0
89	8.5	51	5.5
58	>100	42	6.0
43	23.0		
Metastabile Peaks:			
57.9		68.0	
		56.5	

Tabelle 1: Massenspektrometrie von a) N-Azetylchlorphentermin und b) N-Benzoylchlorphentermin. Massenspektrometer Varian MAT CH5, Einlaß über die direkt geheizte Sonde, Ionisationsenergie 70 eV (s.auch unter 2.8).

2.2.4. 1-(4'-chlorphenyl)-2-methyl-2-Nitropropan (CP-NO_2)
CP-NO_2 wurde durch Oxidation von Chlorphentermin mit Kaliumpermanganat nach der allgemeinen Methode von KORNBLUM und Mitarbeitern (1956) synthetisiert. Kaliumpermanganat

(108g) wurde in kleinen Portionen über 2 h verteilt einer Lösung zugegeben, die Chlorphentermin Hydrochlorid (20g) und gereinigtes Magnesiumsulfat (17g) in Azeton (250 ml) und Wasser (50 ml) enthielt. Der Reaktionsansatz wurde für 16 h bei 45°C gehalten, anschließend zur Entfernung von Magnesiumdioxid gefiltert und überschüssiges Kaliumpermanganat im Filtrat mit 100 Volumina H_2O_2 entfernt. Nach nochmaliger Filtration wurde das Filtrat auf dem Rotationsverdampfer auf 100 ml eingeengt. das wässrige Konzentrat wurde mit Chloroform (400 ml) extrahiert, die organische Phase zweimal mit 1M HCl (50 ml) gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, und der visköse ölige Rückstand kristallisierte bei 4°C in blaßgrünen Nadeln. Dies Material war dünnschichtchromatographisch in Fließmittel D und gaschromatographisch rein, und die Struktur von CP-NO_2 wurde massenspektrometrisch bestätigt. Das zugehörige Massenspektrum ist in Abb. 4 dargestellt, Tab. 2 zeigt die wahrscheinliche Struktur der häufigeren Ionen. Die metastabilen Peaks bei m/e = 93,5 und m/e = 63,2 sind Zerfällen von 167 nach 125 bzw. der Elimination von HCl aus 125 (Chlortropyllium) zuzuordnen.

2.2.5. N-Hydroxychlorphentermin (CP-NHOH)

CP-NO_2 (5g) gelöst in 25 ml Tetrahydrofuran wurden über 30 min tropfenweise einer Suspension von Aluminiumamalgam (aus 5,4 g Aluminiumfolie (MÜLLER et al., 1964)) in Tetrahydrofuran (90 ml) und Wasser (10 ml) bei 0°C zugegeben. Das Filtrat der Reaktionsmischung wurde über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, und nach nochmaliger Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand wurde in Diäthyläther aufgenommen und mit einem Überschuß einer Lösung von HCl-Gas in Äther (2,5M) behandelt. Nach Einengen und Zugabe von Azeton (5 ml) schieden sich weiße Kristalle von N-Hydroxychlorphentermin Hydrochlorid ab. Der Schmelzpunkt (145°C) stieg auch nach

mehrmaligem Umkristallisieren aus Azeton nicht an. Die Elementaranalyse ergab C: 50,98%; H: 6,35%; N: 6,08% (Errechnet: C: 50,85%; H: 6,36%; N: 5,93%). Die Anwesenheit einer reduzierenden Hydroxylaminfunktion wurde durch die starke Reduktion von Triphenyltetrazolium zu einem violetten Farbstoff bestätigt. Die Massenspektrometrie des Trimethylsilyl-Derivats, hergestellt wie unten beschrieben, bestätigte die Struktur des Syntheseproduktes (Abb. 5).

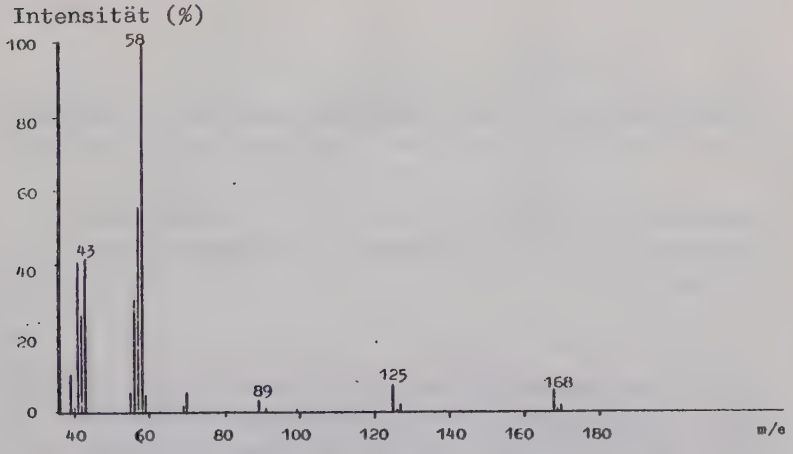


Abbildung 3 : Massenspektrum von Chlorphentermin. Massenspektrometer Varian Mat CH5, Einlaß über die direkt geheizte Sonde, Ionisationsenergie 70 eV (s. 2.8.)

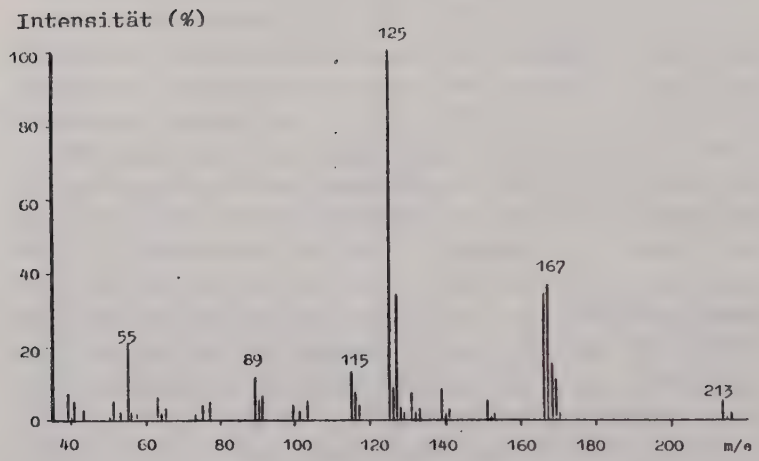


Abbildung 4 : Massenspektrum von 1-(4'-chlorphenyl)-2-methyl-2-Nitropropan (CP-NO_2). Bedingungen wie in Abb. 3.

2.2.6. Versuch der Synthese von N-(2"-oxopropyliden)-1-(4'-chlorophenyl)-2-amino-2-Methylpropan (OCAMP)

1,5 g Chlorphentermin Hydrochlorid wurde wie zuvor als freie Base dargestellt. 0,48 g Methylglyoxal in 5 ml Eisessig und 10 ml Wasser wurden zugegeben und die Emulsion bei Zimmertemperatur 30 min lang gerührt. Die klare Lösung wurde mit 2M NaOH auf pH 8,5 eingestellt und die aufgetretene Trübung mit dreimal 2 Volumina Diäthyläther ausgeschüttelt. Nach Abziehen des Lösungsmittels der vereinigten organischen Phasen unter Vakuum blieb ein braunes Öl zurück, welches in der Kälte (-5°C) nach drei Tagen erstarrte. Das Produkt ergab bei der Dünnschichtchromatographie einen

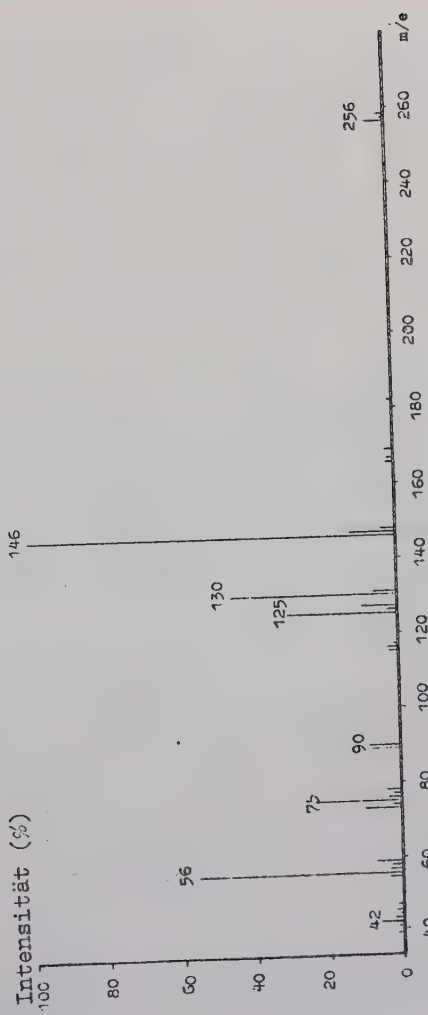
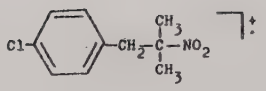
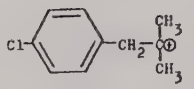
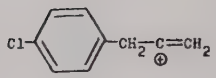
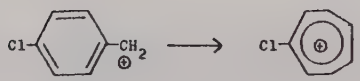


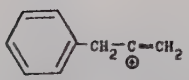
Abbildung 5 : Massenspektrum von N-Hydroxychlorphentermin (CP-NHOH) als O-Trimethylsilyl-Derivat. Bedingungen wie in Abb. 3.

213 

167 

151 

125 

115  (151 - HCl)

89 (125 - HCl)

Tabelle 2 : Wahrscheinliche Struktur der häufigsten Ionen aus dem Massenspektrum von 1-(4'-chlorphenyl)-2-methyl-2- Nitropropan (CP-NO_2)(s.Abb. 4).

einzigen Flecken bei R_f= 0.71 (Fließmittel B, s. 2.7.1.) mit einer gelben Farbreaktion mit p-Dinitrophenylhydrazin (s. 2.7.2.5.). Bei der Gaschromatographie (2.7.3.) wurden zwei Peaks beobachtet mit T_{R1}= 1,0 min und mit T_{R2}= 2,9 min (Säulentemperatur 190°C, Injektor 300°C, Detektor 240°C). Der Peak bei T_{R1}= 1.0 min entspricht Chlorphentermin und ist wahrscheinlich Ausdruck der Thermoinstabilität des Syntheseproduktes; der Peak bei T_{R2}= 2.9 min wurde unter ähnlichen Bedingungen mit GLC-MS, wie unter 2.8.1.1. beschrieben, untersucht (Injektor 270°C, Säule 190°C, Interface 205°C, Separator 210°C, line-of-sight Einlaßkapillare 210°C, Ionenquelle 210°C. Das Massenspektrum zu T_{R2} ergab einen Molekülpeak m/e = 237; weitere Peaks für m/e = 222, m/e = 194, m/e = 167, m/e = 125 zeigten ebenfalls die charakteristische Chlor-Isotopenverteilung (Abb. 6). Dem Basispeak m/e = 112 und m/e= 70 fehlte ein solcher zweiter Isotopenpeak. Die wahrscheinliche Natur dieser Ionen ist in Tab. 3 angegeben. Hochauflösende Massenspektrometrie in der peak-matching Technik (2.8.2.1.)(Ionenquelle 80°C) ergab für m/e = 112 den genauen Wert m/e = 112,0729, entsprechend einer Elementarzusammensetzung $C_6H_{10}NO$ (errechnet: 112.0762, Abweichung $-3{,}3 \times 10^{-3}$ Masseneinheiten). Diese Zusammensetzung stimmt mit der angenommenen Struktur für dieses Fragment überein. Die metastabilen Peaks, welche bei m/e = 93,5 und bei m/e = 63,2 beobachtet wurden, sind die gleichen wie im Massenspektrum von CP-NO_2 (2.2.4.) und wahrscheinlich auf Zerfälle von m/e = 167 nach m/e = 125 bzw. auf die Elimination von HCl aus dem Chlortropyllium-Ion (m/e = 125) zurückzuführen.

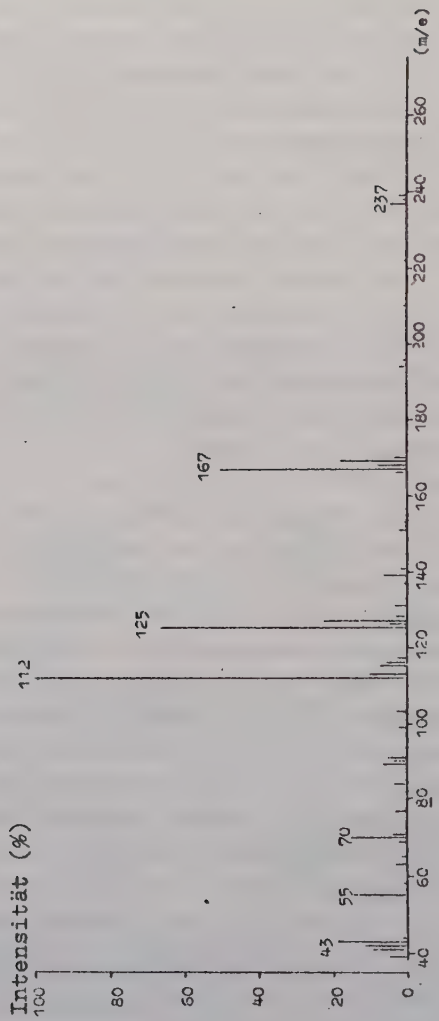
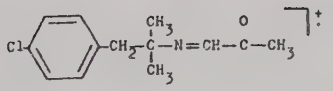
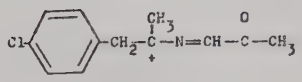
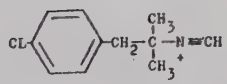
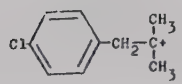


Abbildung 6 : Massenspektrum von N-(2"-oxopropyliden)-1-(4'-chlorophenyl)-2-amino-2-Methylpropan (OCAMP). GLC-MS auf Varian MAT CH5 / Aerograph 1700 (s.2.2.6. u.2.8.11).

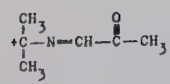
237 

222 

194 

167 

125

112 

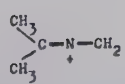
70 

Tabelle 3 : Wahrscheinliche Struktur der häufigsten Ionen aus dem Massenspektrum von N-(2"-oxopropyliden)-1-(4'-chlorphenyl)-2-amino-2-Methylpropan (OCAMP)(Abb 6).

2.3.1. Versuchstiere

Weibliche Wistar Albino Ratten (200 ± 15 g), weibliche Kaninchen (Holland; 2,3 ± 0,3 kg), weibliche Dunkin-Hartley Meerschweinchen (775 ± 25 g), weibliche Rhesusaffen (Macaca mulatta; 4 kg) und ein männlicher Tamarinaffe (Saguinus oedipus) wurden verwendet. (^{14}C)-Chlorphentermin-Hydrochlorid in wässriger Lösung wurde bei Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen durch die Magensonde peroral appliziert und den Affen nach Sterilisation mittels Ultrafiltration i.m. injiziert. Alle Dosierungen wurden als HCl-Salz angegeben. Die Tiere wurden in entsprechenden Metabolismuskäfigen einzeln gehalten und Urin und Faeces aufgefangen. Die Käfige wurden täglich mit Wasser ausgespült und die Radioaktivität im Waschwasser bei der Kinetik mit berücksichtigt. Feste und flüssige Nahrung wurde ad libitum angeboten.

2.3.2. Probanden

Zwei freiwillige gesunde Probanden im Alter von 22 und 27 Jahren und mit einem Körpergewicht von 67 und 79 kg nahmen jeder 65 mg (^{14}C)-Chlorphentermin-Hydrochlorid in einer Gelatinekapsel ein. Sie sammelten unter normaler Ernährung den gesamten Urin sechs Tage lang.

2.4. Radioaktivitäts-Messungen

2.4.1. ^{14}C in wässrigen Proben

^{14}C in wässrigen Proben wurde mit den Flüssigkeitsszintillationszählern Packard Tri-Carb 3214 und 332o unter Verwendung des von BRAY (1960) angegebenen Szintillators nach der Kanalverhältnismethode mit externem Standard bestimmt.

2.4.2. Radiochromatographie

Radiochromatogramme wurden mit einem Packard Radiochro-

matogramm-Scanner 7200 oder einem Berthold-Dünnschicht-Scanner II durchgemessen. Außerdem wurde ^{14}C auf Papierchromatogrammen bestimmt, indem 1 cm breite Streifen von den entwickelten Chromatogrammen in Querrichtung geschnitten und deren Aktivität einzeln in Zählgläschen gemessen wurde. Auf ähnliche Weise wurden von Dünnschichtträgern o,5 cm breite Streifen des Adsorbens geschabt und unter Szintillator wie unter 2.4.1. gemessen.

2.4.3. Radioaktivität in Faeces

Faeces wurden in 2 Volumina Wasser mit einem Ultraturrax homogenisiert. 10 ml des Homogenisats wurden mit 1 ml 10M NaOH alkalisch eingestellt und 5 ml Wasserstoffperoxid und 5 Tropfen Caprylalkohol zum Entschäumen zugegeben. Die Mischung wurde für 1 - 3 Tage bis zur Entfärbung bei Raumtemperatur belassen und dann wie unter 2.4.1. ^{14}C bestimmt.

2.4.4. Bestimmungen mittels Isotopenverdünnung

Chlorphentermin wurde im Urin durch umgekehrte Isotopenverdünnung bestimmt. Chlorphentermin-Hydrochlorid (1,0g) wurde in verdünntem Urin (1:1 (V/V) in H_2O; 10 ml) gelöst, auf pH 14 mit 10M NaOH eingestellt und mit dreimal 50 ml Diäthyläther ausgeschüttelt. Die kombinierten organischen Phasen wurden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, bis zur Trockne im Vakuum eingeengt, der Rückstand in 6M NaOH aufgenommen und entweder Essigsäureanhydrid (5 ml) oder Benzoylchlorid (5 ml) zugegeben. Nachdem das jeweilige Derivat präzipitiert war, wurde es bis zu konstanter spezifischer Radioaktivität mit Wasser/Äthanol umkristallisiert. Der Gehalt der Urinprobe war dann aus der Kenntnis von spezifischer Äktivität, eingesetzter Urinmenge und zugegebener Menge an unmarkiertem Chlorphentermin errechenbar.

Bei der Bestimmung von Chlorphentermin nach Säurehydrolyse wurde Chlorphentermin-Hydrochlorid (1,0 g) in Urin (5 ml) gelöst , ein gleiches Volumen 12M HCl hinzugefügt und unter Rückfluß 3 h lang gekocht. Extraktion und Derivatisation wurde danach wie oben durchgeführt.

2.5. Urinhydrolyse

2.5.1. β-Glucuronidase

Urinproben wurden mit Eisessig auf pH 5 eingestellt, 0,5 Volumina Azetatpuffer (pH 5; 0,2M) zugegeben, mit einer gleichen Menge von β-Glucuronidase (Ketodase^{R}; Warner Chilcott Laboratories, Eastleigh, Hants., Großbritannien) versetzt und das Gemisch bei 37°C 24 h lang inkubiert. Das Inkubat wurde entweder direkt chromatographiert oder entsprechend extrahiert. Kontrollen wurden mit gekochtem Enzym durchgeführt.

2.5.2. Sulphatase

Urinproben wurden mit Eisessig auf pH 5 eingestellt und 0,1 Volumina Sulphatase-Lösung (H-2^{R}; Sigma Chemical Co.; enthält auch β-Glucuronidase-Aktivität) und 0,5 Volumina Azetatpuffer (pH 5, 0,2M) zugegeben; die β-Glucuronidase-Aktivität wurde mit Saccharo-1,4-Lacton (Sigma Chemical Co.; 10^{-4}M) gehemmt. Nach erfolgter Inkubation bei 37°C über 24 h wurde die Lösung direkt chromatographiert oder einer entsprechenden Extraktion zugeführt. Entsprechende Inkubationen mit gekochtem Enzym dienten als Kontrolle.

2.5.3. Säurehydrolyse

Gleiche Volumina von Urin und 12M HCl wurden zusammen für 3 h unter Rückfluß erhitzt (95°C); nach Neutralisation wurde das Hydrolysat für die Dünnschichtchromatographie verwendet.

2.6. Extraktionen

2.6.1. XAD-2

Amberlite XAD-2 Resin (100 g)(BDH Chemicals Ltd., Poole, Großbritannien, und Serva Feinbiochemica, Heidelberg) wurde mit viermal 400 ml Azeton, dreimal 300 ml Methanol und dreimal 300 ml Wasser gewaschen, in eine Säule gepackt (0,25 g/ml Urin) und die Urinprobe mit 10ml/min durchgegeben. Die Säule wurde mit dem doppelten Volumen Wasser gewaschen, mittels Durchströmen mit sauerstofffreiem Stickstoff getrocknet und mit zwei Volumina Methanol eluiert. Die wässrigen Fraktionen enthielten zusammen 1 - 3 % der applizierten Radioaktivität, praktisch die gesammte restliche Aktivität wurde mit der methanolischen Phase eluiert. Diese Phase wurde in Portionen zu 0,1 Volumina aufgefangen, und in den ersten vier Fraktionen fand sich sich 60 - 80 % der Gesamtaktivität. Diese Fraktionen wurden für die Chromatographie unter Vakuum eingeengt.

2.6.2. Lösungsmittel - Extraktionen

Urinproben mit einem Gehalt um 0,1 µmol radioaktiven Materials wurden mit 0,5 Volumina eines 1N Phosphatpuffers (pH 7,0) eingestellt und 1 h lang mit zwei Volumina Diäthyläther ausgeschüttelt. Die Phasen wurden durch Zentrifugieren getrennt und die Radioaktivität jeweils bestimmt. Die organische Phase wurde eingeengt und für die Chromatographie benützt.

2.7. Chromatographische Methoden

2.7.1. Papier- und Dünnschichtchromatographie

Absteigende Papierchromatographie wurde auf Chromatographiepapier Whatman No.1 durchgeführt. Für aufsteigende qualitative Dünnschichtchromatographie (DC) wurde Silicagel 60 F_{254}, 0,20 mm dick auf Aluminiumfolie (Art.

5562), 0,25 mm dick auf Kunststoffolie (Art. 5735) und 0,25 mm dick auf Glasplatte (Art. 5715), jeweils von E. Merck, Darmstadt, verwendet. Für die präparative Schichtchromatographie (PSC) wurde die letztgenannte Qualität und Silicagel 60 F_{254} 2,0 mm dick auf Glasplatte (Art. 5717, E. Merck, Darmstadt) für den ersten Reinigungsschritt verwendet, für die folgenden Präparationsschritte wurden Woelm DC-Fertigplatten Kieselgel ohne Fluoreszenzindikator (0,20 mm dick) eingesetzt, weil aus den Merck-Produkten offensichtlich bei der Elution der Banden Fluoreszenzindikator und Bindemittel herausgelöst wurden und diese im Massenspektrometer, vor allem jedoch durch Löschung bei der Kernresonanzspektrometrie störten. Die Platten für die PSC wurden mit einem Desaga Autoliner beschickt, nachdem sie zuvor zur Reinigung in Methanol leer vorentwickelt worden waren.

Die verwendeten Fließmittelsysteme waren:

A. n-Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5; obere Phase) (DUBNICK et al., 1968)
B. n-Butanol/Essigsäure/Wasser (8:2:2) (RANDERATH, 1966)
C. Chloroform/Methanol (1:1)
D. n-Hexan/Diäthyläther/Dichlormethan (4:3:2) (A.H.BECKETT, private Mitteilung)
E. n-Butanol/Essigsäure/Wasser/Methanol (6:2:2:2)
F. Chloroform/Äthanol/Essigsäure/Wasser (60:35:5:5)

Papierchromatogramme wurden in Fließmittel A vom Start 35 cm weit entwickelt; die Fließmittel B - F dienten zur DC und PSC, wo Chromatogramme 12 cm weit entwickelt wurden; die R_f-Werte für Chlorphentermin und verwandte Substanzen sind in Tab. 4 aufgeführt.

2.7.2. Detektion von Verbindungen auf Chromatogrammen

Die folgenden Sprühreagenzien fanden Verwendung (s. auch Tabelle 5) :

2.7.2.1. BKG : 0,5% (G/V) Bromkresolgrün in Äthanol (DUBNICK et al.,1968);

2.7.2.2. DMAC : 10% (G/V) Dimethylaminozimtaldehyd in Äthanol, vor Gebrauch mit 1/10 Volumen 2N HCl angesäuert (var. nach HARLEY,MASON et al., 1958);

2.7.2.3. TTZ : 0,5% (G/V) 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid in 6M NaOH/Methanol (1/1)(METZ, 1961);

2.7.2.4. Stärke/KJ : Chomatogramme wurden mit einer Natriumhypochlorit-Lösung (entspr. 4% Cl_2) besprüht und in einer mit Essigsäure gesättigten Atmosphäre bei 80°C getrocknet . Sie wurden anschließend mit einer Stärke - Kaliumjodid -Lösung (je 0,1%) angesprüht (JAMES et al., 1972);

2.7.2.5. DNPH : Chromatogramme wurden mit einer Lösung von 0,4% (G/V) 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 2N HCl besprüht, getrocknet und dann mit 0,2% (G/V) Kaliumhexacyanoferrat (III) in 2N HCl angesprüht (MEHLITZ et al., 1963);

2.7.2.6. Ninhydrin : E.Merck, Darmstadt, Art. Nr. 6758.

Zusätzlich konnten die meisten Verbindungen auf DC durch Löschung des UV-Lichtes einer Hanovia Chromalite (254 nm) erkannt werden.

2.7.3. Gaschromatographie (GLC)

Ein F&M 402 Gaschromatograph (Hewlett-Packard Inc., Pasadena, Calif., U.S.A.) mit Flammenionisationsdetektor und einer gepackten Glassäule (1,80m, innerer Ø 3 mm; 3% SE 30 auf Chromosorb GAW-DMCS) wurde benützt. Der Trägergasfluß betrug 30 ml N_2/min; der Detektor wurde mit 40 ml H_2/min und 300 ml/min Luft betrieben.

	Fließmittel (2.7.1.)						Sprühreagenz (2.7.2.)	Farbreaktion
	A	B	C	D	E	F		
CP	0.86	0.58	0.36	0.00	0.81	0.48	BKG/DMAC	blau/gelb
CP-NHOH	0.91	-	0.79	0.07	-	-	TTZ	violett
CP-NO_2	0.95	-	0.93	0.74	-	-	TTZ	violett$^+$
N-Succinyl-CP	0.93	-	-	-	-	-	Stärke/KJ	braun
CP-N-O-Glucuronid (Metabolit)	0.67	-	0.30	0.00	-	-	-	-
Metabolit X	0.70	0.45	-	-	0.70	0.30	Ninhydrin/BKG/ DNPH/DMAC/TTZ	rot/blau/ gelb/gelb$^+$/violett$^+$
OCAMP	0.97	0.71	-	-	-	-	Ninhydrin/TTZ/ DNPH	rot/violett$^+$/ gelb
								$^+$=nach Erhitzen

Tabelle 4 : Papier- und Dünnschichtchromatographie von Chlorphentermin und seinen Derivaten. Erläuterungen siehe unter 2.7.1. und 2.7.2..

2.7.4. Derivatisierung für die Gaschromatographie

2.7.4.1. Silylierung

N-Hydroxychlorphentermin als Bezugssubstanz und als Metabolit wurde jeweils als Trimethylsilylderivat in der GLC analysiert. 0,1 mg der freien Base des Salzes von CP-NHOH, dargestellt durch Ätherextraktion aus neutraler wässriger Lösung, oder eine entsprechende Menge aus einem Urinextrakt, wurden unter strömendem Stickstoff bis zur Trockne bei 30°C eingedampft; der Rückstand wurde in 0,5 ml Benzol aufgenommen und mit 0,1 ml Bistrimethylsilylazetamid (BSA) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 3 Stunden unter Stickstoff bei 50°C inkubiert, anschließend unter strömendem Stickstoff eingedampft und in 0,05 ml Benzol aufgenommen für GLC und GLC-MS verwendet.
Silylierungsversuche an anderen Verbindungen wurden entsprechend durchgeführt.

2.7.4.2. Methylierung

2 ml der zu methylierenden Verbindung wurden mit Diazomethangas durchperlt, welches aus einer Mischung von KOH in äthanolischer Lösung und Diazald^{R} in Diäthyläther freigesetzt wurde, bis die Gasentwicklung in der Vorlage aufhörte und sich die Lösung der Verbindung in der Vorlage durch einen Überschuß an unreagiertem Diazomethan gelb zu färben begann. Das Reaktionsgemisch wurde sofort unter strömendem Stickstoff eingedampft und in 50 µl Methanol aufgenommen.

2.7.4.3. Azetylierung

0.2 ml einer 0,1%igen Lösung der zu derivatisierenden Substanz in Pyridin wurden mit 0,2 ml Essigsäureanhydrid versetzt und 12h unter Stickstoff bei Raumtemperatur gehalten. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter Stickstoff entfernt und der Rückstand in 50 µl Methanol aufgenommen.

2.7.4.4. Trifluoroazetylierung

Es wurde wie unter 2.7.4.3. vorgegangen, indem Essig-

säureanhydrid durch Trifluoressigsäureanhydrid ersetzt wurde und die Reaktionszeit auf 2 h verkürzt wurde.

2.8. Massenspektrometrie

2.8.1. Gekoppelte Gaschromatographie - Niederauflösende Massenspektrometrie (GLC-MS)

2.8.1.1. Varian Aerograph 1700 - MAT CH5

Der Varian Aerograph 1700 Gaschromatograph war über einen Biemann-Watson Separator mit einem Varian MAT CH5 Massen - spektrometer verbunden; die Trennung erfolgte auf einer gepackten Glassäule (1,5 m, innerer Ø 2 mm; 3% OV-101 auf Celite AW-DMCS).

2.8.1.2. Finnigan 3300/6000 : Das GLC-MS System Finnigan 3300/6000 arbeitete mit einer Glaskapillarsäule (20 m; stationäre Phase OV-1), wahlweise Elektronen- oder chemischer Ionisation durch Isobutan, und einem on-line-Computer, der 33 Spektren (m/e = 40-450) je min aufnahm.

2.8.2. Hochauflösende Massenspektrometrie

2.8.2.1. Die peak-matching-Technik wurde mit einem Varian MAT 731 Massenspektrometer mit direktem Sondeneinlaß in Verbindung mit einem Varian Data 620/i Computer durchgeführt.

2.8.2.2. Mit dem AEI MS 9 Massenspektrometer wurden hochaufgelöste Massenspektren aufgenommen und über ein on-line-Datensystem erfaßt.

Die Ionisationsenergie betrug jeweils 70 eV, zur Eichung diente Perfluoralkan.

2.9. Kernresonanzspektrometrie

Die Spektren wurden bei Zimmertemperatur auf einem Blumberg & Co HX-90 Kernresonanzspektrometer als 90 MHz - Fourier - NMR aufgenommen. Interner Standard war Tetramethylsilan.

2.10. Andere spektrometrische Methoden

2.10.1. Infrarot-Spektrometrie der synthetischen Verbindungen wurde mit einem Perkin-Elmer Infracord Spektrometer mit Hilfe der Kaliumbromidscheiben-Methode durchgeführt.

2.10.2. Ultraviolett-Absorptionsspektren wurden mit einem Pye-Unicam-UV-Spektrophotometer SP 1800 aufgenommen, als Lösungsmittel diente Methanol.

3. Ergebnisse

3.1. Identifikation von Metaboliten

3.1.1. N-oxidierte Metaboliten

3.1.1.1. N-Hydroxychlorphentermin (CP-NHOH)

CP-NHOH und dessen NO-Glucuronid sowie CP-NO_2 wurden zunächst zur Identifikation aus Kaninchenurin in größerer Menge als radioaktive Metabolite isoliert. Gefilterter Urin (10ml) von Kaninchen, die tags zuvor ^{14}C-CP (100mg/kg) erhalten hatten, wurde wie unter 2.5.1. und 2.5.2. beschrieben mit β-Glucuronidase oder Sulphatase inkubiert. Die Inkubate und unbehandelte Urinproben wurden entsprechend 2.6.2. mit Diäthyläther extrahiert und die Radioaktivität der Phasen bestimmt. Aus den nichthydrolysierten Proben und denjenigen, die mit Sulphatase inkubiert wurden, waren 11% der Aktivität Äther-extrahierbar, wogegen die extrahierbare Aktivität nach β-Glucuronidase-Inkubation auf 33% der Gesamtaktivität anstieg. Ein Teil jeder organischen Phase wurde nach Einengen mit DC in Fließmittel C (2.7.1.) aufgetrennt und ein Hauptpeak bei R_f=0,79 festgestellt, entsprechend synthetischem CP-NHOH; daneben fand sich ein kleiner radioaktiver Peak bei R_f=0,93 entsprechend CP-NO_2 (s.3.1.1.2.). Der Hauptpeak war radioaktiv und reagierte positiv mit TTZ (2.7.2.3.).

Eine Probe des Konzentrates wurde mit BSA (2.7.4.1.) derivatisiert und gaschromatographisch analysiert. Abb. 7 zeigt ein typisches Gaschromatogramm des trimethylsililierten synthetischen CP-NHOH und des derivatisierten Metaboliten. Die Säulentemperatur betrug 160°C, Injektortemperatur war 205°C und Detektortemperatur 224°C. In Tab. 5 sind die Retentionszeiten unter diesen Bedingungen von CP, Trimethylsilyl-CP-NHOH und CP-NO_2 aufgeführt; CP und sein Nitroanalogon bilden keine stabilen Silylierungsprodukte. Peaks dieser Retentionszeiten wurden nicht nach Aufarbeitung von Kontrollurin beobachtet. Der isolierte Metabolit

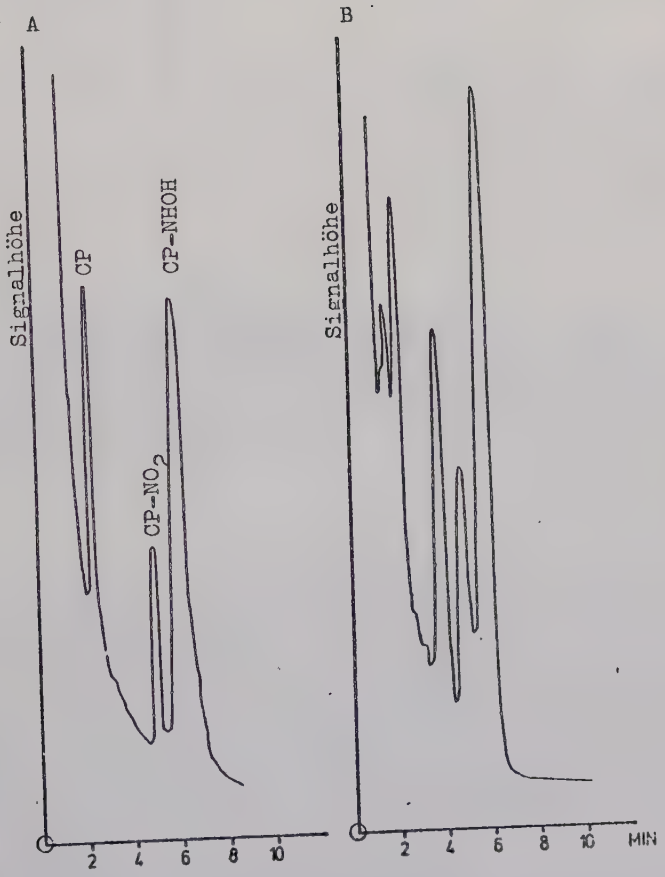


Abbildung 7 : Gaschromatographie von Trimethylsilyl-CP-NHOH (A) und eines Metaboliten aus Kaninchenurin (B). Analysenbedingungen wie in Tab. 5.

Verbindung	Retentionszeit
CP	2,0 min
Trimethylsilyl-CP-NHOH	5,6 min
CP-NO_2	4,6 min

Tabelle 5: Gaschromatographie von CP und seinen Derivaten. Gerätedaten wie unter 2.7.3., Säulentemperatur 160°C, Injektor 205°C, Detektor 224°C.

hatte als flüchtiges Derivat die gleiche Retentionszeit wie authentisches silyliertes CP-NHOH. Zusätzliche kleinere Peaks entsprechen CP und CP-NO_2 und werden auch im Chromatogramm der Vergleichssubstanz beobachtet; sie entstehen wahrscheinlich bei der Derivatisation oder Injektion, zudem war CP-NO_2 in geringer Menge in der Präparation enthalten (s.o.)

Das gleiche Untersuchungsmaterial wurde massenspektrometrisch mit dem GLC-MS-System Varian Aerograph 1700/ MAT CH 5 (2.8.1.1.) untersucht (Säule 150°C, Einlaß 180°C, Interface 170°C, Separator 160°C, Line-of-Sight Einlaßkapillare 180°C, Ionenquelle 200°C). Das Massenspektrum des größten Peaks mit T_R=2,6 min ist in Abb. 8 dargestellt; es stimmt überein mit dem entsprechenden Spektrum von synthetischem Trimethylsilyl-CP-NHOH.(Abb. 5).

3.1.1.2. 1-(4'-chlorophenyl)-2-methyl-2-Nitropropan (CP-NO_2)
Da CP-NO_2schon bei der Aufarbeitung von CP-NHOH für die Gaschromatographie entstand (s. 3.1.1.1.), wurde die Identifikation dieses Metaboliten verändert durchgeführt, obwohl auch CP-NO_2 mit Diäthyläther aus neutraler wässriger Lösung vollständig ausgeschüttelt werden kann. Gefilterter Urin (150 ml) von mehreren wie unter 3.1.1.1. dosierten

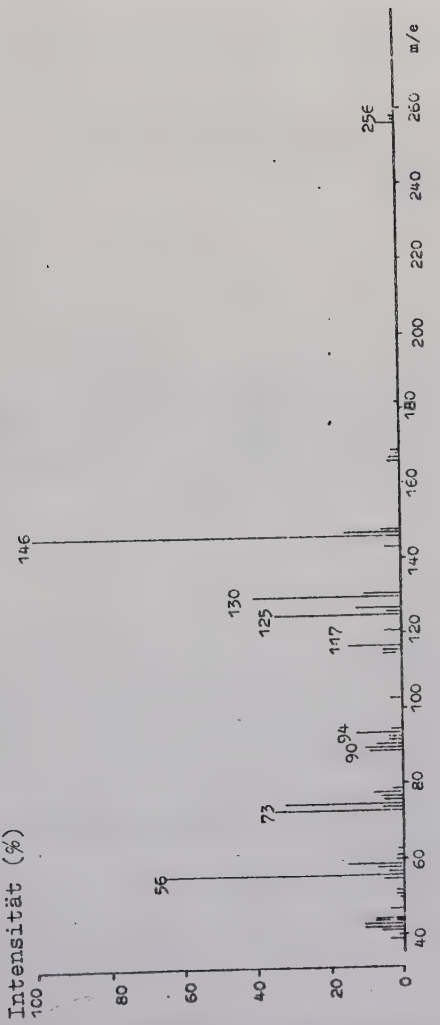


Abbildung 8: Massenspektrum eines CP-Metaboliten aus Kaninchenurin; vgl. Abb.5. GLC-MS auf Varian MAT CH5/ Aerograph 1700(2.8.1.1.); T_R=2,6 min bei Säulentemperatur 150°C, Einlaß 180°C, Interface 170°C, Separator 160°C, Line-of-Sight Einlaßkapillare 180°C, Ionenquelle 200°C.

Kaninchen wurde auf XAD-2 (2.6.1.) extrahiert und das Eluat auf 4 ml eingeengt. Das Konzentrat wurde auf zwei PSC-Platten aufgetragen (2.7.1.) und die Chromatogramme in Fließmittel D (2.7.1.) entwickelt. Ein großer Teil der Radioaktivität blieb am Start liegen, aber ein kleinerer Peak mit R_f=0,75 wurde abgetrennt, der mit einem stark UV-löschenden Bereich zusammenfiel. Das Verhältnis der Radioaktivitätsbanden wurde durch vorherige Inkubation mit Glucuronidase (2.5.1.) oder Sulphatase (2.5.2.) nicht verändert. Der Peak mit R_f=0,75 wurde mit Methanol von der Platte eluiert und auf DC in Fließmittel D (2.7.1.) rechromatographiert. Ein einziger Radioaktivitätspeak wurde bei R_f=0,76 gemessen, der UV intensiv löschte und eine positive TTZ-Reaktion ergab (2.7.2.3.); für synthetisches CP-NO_2 ist R_f=0,74, es wird eine übereinstimmende Farbreaktion beobachtet (s.Tab. 4).

Mit der direkt geheizten Einlaßsonde des Massenspektrometers Varian MAT CH5 (2.8.1.1.) wurden 2 µl des konzentrierten Eluates von der PSC bei einer Ionenquellentemperatur von 30°C eingeführt. Das erhaltene Massenspektrum des Metaboliten (Abb.9) stimmte mit dem der synthetischen Verbindung (Abb.4) überein.

3.1.2. Charakterisierung und versuchte Identifizierung eines weiteren Metaboliten (X)

Bei der Papierchromatographie von Urin von ^{14}C - CP - behandelten Ratten in Fließmittel A (2.7.1.) wurden zwei radioaktive Peaks festgestellt: der größere mit R_f=0,86 entsprach CP, während ein kleinerer konstant etwa ein Drittel der Intensität des ersten zeigte und einen R_f= 0,70 erreichte. Die beobachteten Farbreaktionen der Peaks sind in Tab. 4 augeführt. Der kleinere Peak verschwand zugunsten von CP nach vorheriger saurer Hydrolyse der

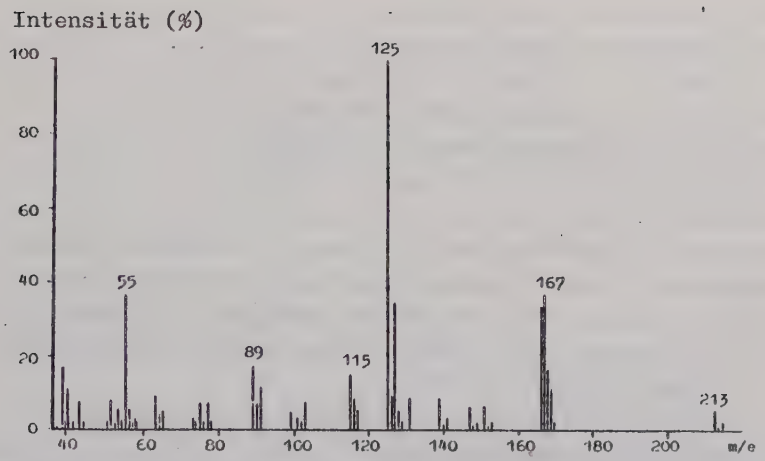


Abbildung 9 : Massenspektrum eines CP-Metaboliten aus Kaninchenurin; vgl. Abb. 4. Bedingungen wie in Abb. 3, Ionenquelle 30°C.

Urinprobe (2.5.3.). Bei umgekehrter Isotopenverdünnung mit Rattenurin nach Säurehydrolyse (2.4.4.), nicht jedoch nach Behandlung des Urins mit β-Glucuronidase oder Sulphatase (2.5.), wurde praktisch die gesamte Radioaktivität als CP erfaßt (98 - 101%), was auch der Quantifizierung diente (3.2.3). Ein ähnlicher Anstieg von CP nach saurer Hydrolyse wurde bei Urinproben von mit ^{14}C-CP behandelten Kaninchen und Tamarinaffen beobachtet, woraus auf Anwesenheit diese säurelabilen Metaboliten auch im Urin dieser beiden Spezies geschlossen wurde. Beim Tamarin konnte diese Beobachtung auch papierchromatographisch verfolgt werden, während beim Kaninchen die Interferenz des unbekannten Metaboliten (X) mit dem Glucuronid von CP-NHOH (Tab.4) dies verhinderte.

Da es sich möglicherweise um ein Artefakt aus einer Reak-

tion von unverändert ausgeschiedenem Cp mit Urinbestandteilen handelte, wurde eine entsprechende Menge ^{14}C-CP 12 h lang bei 37°C in frisch gesammeltem Urin von unbehandelten Ratten inkubiert. DC in Fließmittel B (2.7.1.) zeigte nur den CP entsprechenden Peak.

N-Azetyl- (2.2.1.) und N-Succinylchlorphentemin (2.2.3.) wurden als mögliche Metaboliten durch umgekehrte Isotopenverdünnung (2.4.4.) ausgeschlossen; ein Bernsteinsäurekonjugat wurde deshalb in Erwägung gezogen, weil WEINSTOCK und Mitarbeiter (1969) dies für D,L-4'-chloro-2-äthylamino-Propiophenon nachweisen konnten.

3.1.2.1. Biliäre Exkretion von X

Da Verbindungen mit einem Molekulargewicht über 325 ± 50 im allgemeinen von der Ratte nicht in nennenswerter Menge über die Galle ausgeschieden werden (MILLBURN et al., 1967), bietet die Gallengangskanülierung die Möglichkeit, das Molekulargewicht eines Metaboliten abzuschätzen. Nach der Methode von ABOU-EL-MAKAREM und Mitarbeitern (1967) wurden bei drei Ratten unter Thiopental-Anästhesie Gallengangskanülen gelegt. Um eine Interferenz zwischen dem Anästhetikum und dem zentral stimulierenden Effekt von CP zu vermeiden, wurden 20 mg/kg ^{14}C-CP ip erst nach Erwachen der Tiere appliziert (CALDWELL et al.,1972); trotzdem überlebte nur ein Tier einen Tag, die anderen starben vor Ablauf von 2 h. Das überlebende Tier schied 15% der Aktivität mit dem Urin und 2% mit der Galle in 24 h aus; Papierchromatographie der Galle in Fließmittel A (2.7.1.) zeigte zwei radioaktive Peaks mit R_{fX}=0,70 und R_{fCP}=0,86, entsprechend X und CP, in einem Anteil an der Gesamtaktivität von 45% (X) und 55%(CP). Diese anteilmäßig unwesentlich höhere und im Vergleich zur Urinausscheidung geringe Gallengängigkeit von X spricht nicht für ein Molekularge-

wicht von X wesentlich höher als das der Ausgangsverbindung CP.

3.1.2.2. Isolation von X

Zur Isolation einer größeren Menge von X erhielten 20 Ratten mittels Magensonde 100 mg/kg ^{14}C-CP. Kombinierter Urin und Waschwasser enthielten 61% der applizierten Radioaktivität nach 5 Tagen und wurden auf XAD-2 (2.6.1.) extrahiert. In den ersten vier methanolischen Fraktionen fand sich 72% der gesamten Aktivität, diese wurden zusammen eingeengt und für die PSC (2.7.1.) verwendet.

Nach vorherigem Zentrifugieren wurde eine Urinextraktmenge entsprechend einer Aktivität von c.a. 200 µmol CP auf 16 DC-Platten aufgetragen und diese in Fließmittel E entwickelt. Eine repräsentative Platte zeigte einen größeren Peak (75%) entsprechend CP bei R_{fCP}=0,81 und einen kleineren (25%) bei R_{fX}=0,70 entsprechend X, der auch UV-Licht löschte. Die dem Metaboliten X entsprechende Bande wurde von allen Platten mit Methanol vom Träger eluiert. Das Eluat wurde zur Entfernung von suspendiertem Silicagel bei 12000g zentrifugiert und einer weiteren PSC auf 4 Woelm DC-Platten in Fließmittel F unterzogen. Wegen des in diesen Platten nicht vorhandenen Fluoreszenzindikators wurden alle gescannt und ein kleiner radioaktiver Peak (11%) bei R_{fY}=0,11 und ein größerer(89%) bei R_{fX}= 0,29 festgestellt. CP hat in diesem Fließmittel einen R_{fCP}=0,48 (Tab. 4) und wurde nicht gefunden, war also zuvor vollständig abgetrennt worden. Es wurde geschlossen, daß R_{fY} entweder einem Artefakt aus X oder einem weiteren Metaboliten Y entspricht; die Beobachtung konnte nicht weiter verfolgt werden. Das den Metaboliten X enthaltende Trägermaterial wurde wie oben eluiert, das Eluat zentrifugiert und nochmals auf zwei Woelm DC-Platten in Fließ-

mittel F aufgereinigt. Ein einziger Peak bei R_{fX}=0,33 zeigte die radiochromatographische Reinheit der Präparation an, der gegenüber der zweiten PSC etwas höhere R_f-Wert ist auf die geringere Beladung der Platte mit Verunreinigungen zurückzuführen. Die Bande wurde mit Methanol eluiert, bei 20000g eine halbe Stunde zentrifugiert und die aus dem Fließmittel stammende Essigsäure durch dreimaliges Eindampfen auf dem Rotationsverdampfer nach zusatz von Benzol bei 30°C als Azeotrop entfernt.

Die Ausbeute der Präparation entsprach 20 µmol des Metaboliten, errechnet aus der spezifischen Radioaktivität, oder 40% der Theorie. Zur Standardisierung der Kernresonanzspektrometrie (NMR) von Metaboliten wurde das nach dem ersten PSC-Schritt bei R_{fCP}=0,81 gefundene, unverändert ausgeschiedene CP parallel der gleichen Aufreinigung in zwei weiteren PSC wie der Metabolit X unterworfen.

3.1.2.3. Dünnschichtchromatographie von X

Eine Probe des aufgereinigten Metaboliten X (0,1 µmol) wurde in Fließmittel E (2.7.1.)chromatographiert. Die rotviolette Farbreaktion auf Ninhydrin (2.7.2.6.) fiel mit der Radioaktivität zusammen (R_{fX}=0,70). Nach längerer Aufbewahrung von X in Methanol erschien bei dieser DC ein zweiter radioaktiver Peak mit R_{fCP}=0,81, der mit Ninhydrin schwach gelb reagierte und CP entsprach; ein inaktiver Fleck bei R_{fZ}=0,23 färbte sich tief violett an. Dieser Fleck bildet auch ein gelbes 2,4-Dinitrophenylhydrazon mit DNPH (2.7.2.5.), nicht jedoch die beiden erstgenannten. Bei dem Versuch, ein Dansyl-Derivat von X herzustellen (DERTINGER et al.,1973), konnte nur das Derivat von CP nachgewiesen werden.

3.1.2.4. Stabilität von X gegenüber Säure und Alkali

Die Säurehydrolyse von X nach 2.5.3. wurde bereits erwähnt

(3.1.2.). Proben des isolierten Metaboliten wurden bei Zimmertemperatur 12h lang bei pH=9,5 (0,5 M Borat-Puffer), bei pH=10,5 (0,5 M Glycin-Puffer) oder bei pH=14,0 (eingestellt mit 10N NaOH) aufbewahrt. Danach zeigte die Probe mit pH=9,5 keine dünnschichtchromatographischen Zeichen von Zersetzung, dagegen führten die stärker alkalischen Bedingungen zur Freisetzung von CP.

3.1.2.5. Gaschromatographie von X

Der isolierte Metabolit wurde entsprechend 2.7.3. mit GC untersucht. Bei einer Säulentemperatur von 190°C, Einlaßtemperatur von 300°C, Detektortemperatur von 240°C und einem Trägergasstrom von 30 ml/min N_2 ergab eine methanolische Lösung von X (5/ul) einen Peak nach T_{RCP}=1,2min und einen weiteren kleineren bei T_{RX}=3,0 min. Beide Peaks wurden nicht in Kontrollaufarbeitungen von Urin gefunden. Die Retentionszeit T_{RCP}=1,2min entspricht der von authentischem CP und deutet wegen der dünnschichtchromatographischen Reinheit der Präparation (3.1.2.3.) auf eine thermische Labilität von X hin. Die Intensität des zweiten Peaks war deutlich von der Einlaßtemperatur abhängig(Abb.10) und nahm mit steigender Injektortemperatur zu.

Zur Stabilisierung von X wurden Derivatisierungsversuche nach 2.7.4.1.-2.7.4.4. durchgeführt, welche erfolglos blieben, weil entweder keine Reaktion ablief (Silylierung) oder weil die entsprechenden Derivate von CP selbst entstanden, wie jeweils durch GLC-MS erkannt wurde. Bei der Methylierung enstanden verschiedene Produkte, die in der GLC-MS sämtlich keine Chlor-Isotopenverteilung aufwiesen.

3.1.2.6. Niederauflösende Massenspektrometrie von X

Beim Versuch der Massenspektrometrie des isolierten Metaboliten X mit dem unter 2.8.1.1. beschriebenen Massenspektrometer Varian MAT CH5 unter Verwendung des direkten Ein-

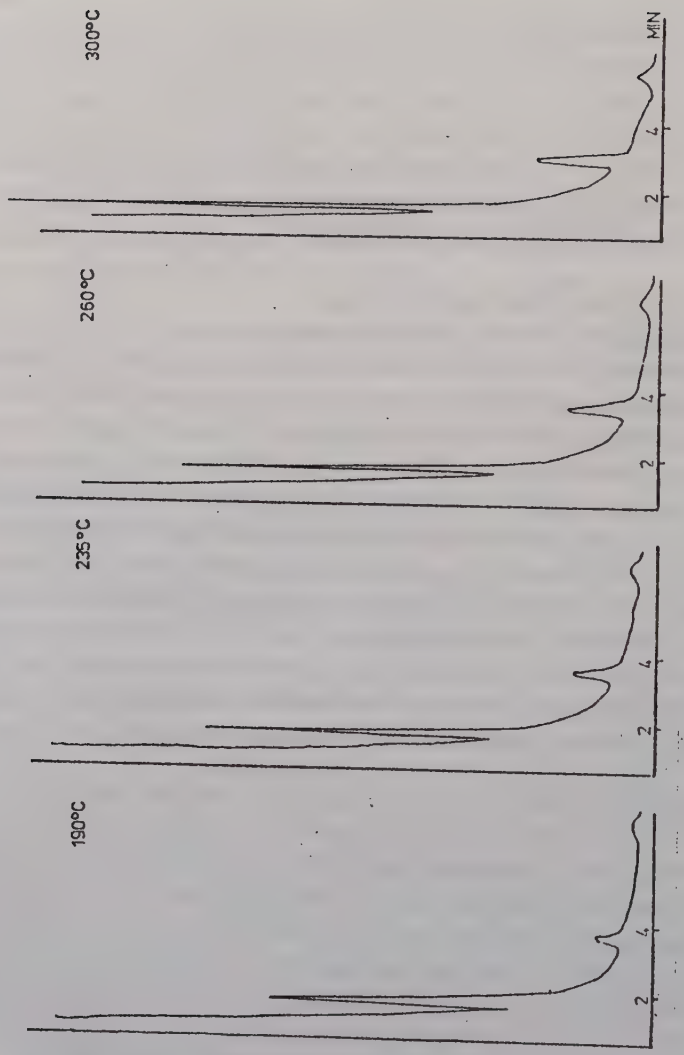


Abbildung 10: Gaschromatographie von X. Peakintensitätszunahme mit steigender Injektortemperatur (s. 3.1.2.5.).

laßsystem konnte kein Spektrum registriert werden. Bei gekoppelter GLC-MS nach 2.8.1.1. (Injektor 250°C, Säule 190°C, Interface 205°C, Separator 210°C, Line-of-Sight Einlaßkapillare210°C, Ionenquelle 210°C) wurden zwei Peaks bei T_{RCP}=0,4 min und T_{RX}=1,2 min erfaßt - entsprechend den beiden oben beschriebenen GLC-Peaks (3.1.2.5.) - und deren Massenspektrum registriert. T_{RCP} wurde als CP identifiziert, das Spektrum zu T_{RX} (Abb 11) enthielt mehrere Peaks mit Chlor-Isotopenverteilung (m/e = 237(M^+), 222, 194, 167, 125) und wurde OCAMP, einer Schiff'schen Base von CP mit Methylglyoxal, zugeordnet. Massenspektrometrie von synthetisiertem OCAMP (2.2.6.) bestätigte diese Vermutung (vgl. Abb.6 und Tab.3).

Da X und OCAMP sich dünnschichtchromatographisch deutlich verschieden verhalten (Tab.4), muß daraus und aus der Temperaturabhängigkeit der Peakintensität in der GLC sowie der Freisetzung von CP geschlossen werden, daß es sich bei OCAMP um eine Artefaktbildung in der GLC handelt.

Die empfindlichere GLC-MS mit Finnigan 3300/6000 und chemischer Ionisation (2.8.1.2.)(Programm 6°C/min, Start bei 30°C, Stop bei 130°C) zeigte im Gaschromatogramm 18 Peaks, von denen 12 im Massenspektrum eine Monochlor-Isotopenverteilung (T_R=7,6 min bis T_R=22,0 min) und drei eine Dichlor-Isotopenverteilung (T_R=25,5 min bis T_R=29,5 min) aufwiesen (Abb.12). Das Spektrum zu T_R=7,6 min entsprach bei weitaus dem höchsten Ionenstrom CP, das bei T_R=12,7 min OCAMP. Der höchste Wert für m/e (427) wurde für die Dichlorverbindung mit T_R=29,5 min gemessen. Bei Einsatz der Elektronenionisation hätte die Fragmentierung in den einezelnen Spektren verbessert werden können, doch reichte dann die Empfindlichkeit des Geräts für die Spuren von lang retinierten Verbindungen nicht aus.

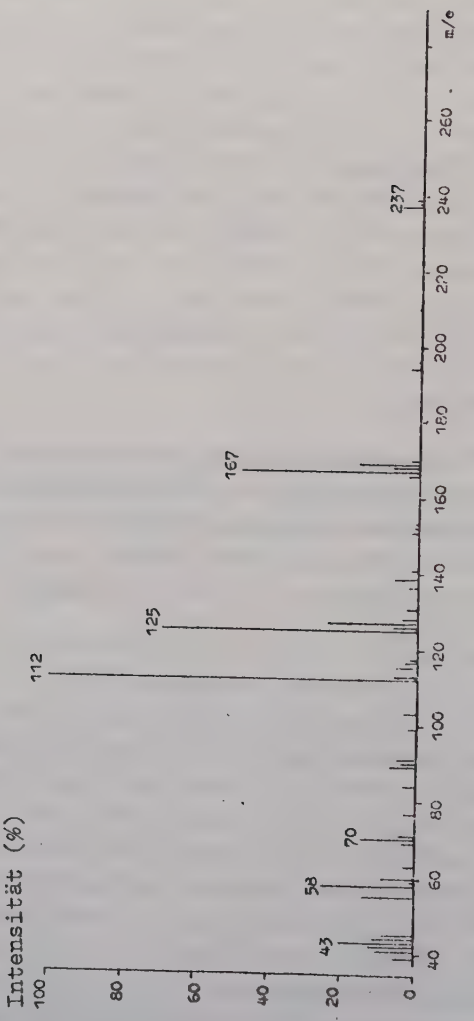


Abbildung 11: Massenspektrum eines Metaboliten (X) aus Rattenurin. Analysenbedingungen wie unter 3.1.2.6.. Vgl. Abb. 6 und Tab. 3

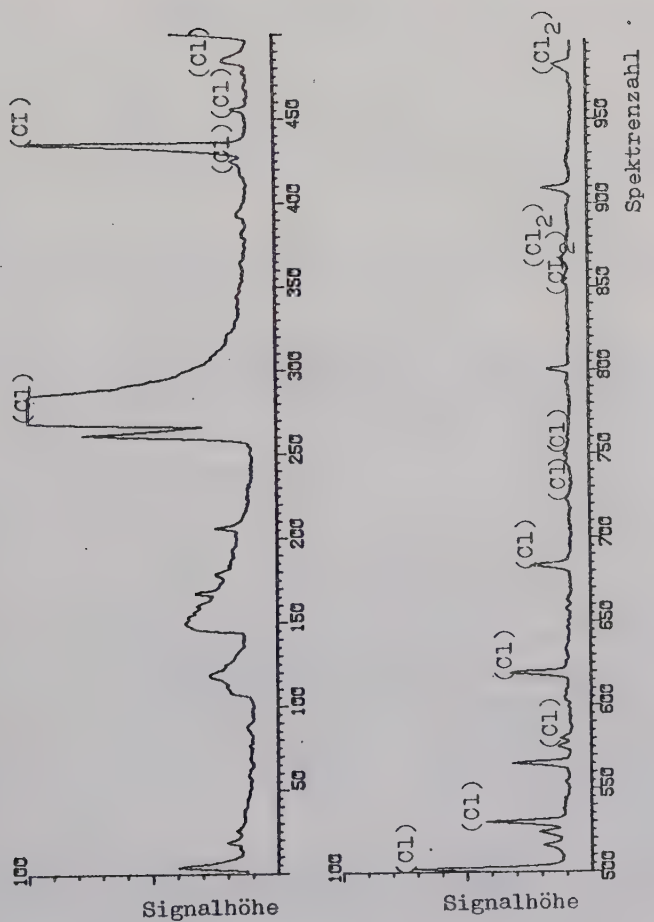


Abbildung 12: GLC-MS des Metaboliten X aus Rattenurin mit Finnigan 3300/6000 und chemischer Ionisation (2.8.1.2.); Gaschromatogramm mit Angabe der Chloratome in den den Peaks zugehörigen Spektren, bestimmt aus der Cl-Isotopenverteilung (s. 3.1.2.6.).

3.1.2.7. Hochauflösende Massenspektrometrie

Mit der unter 2.8.2.1. beschriebenen peak-maching Technik wurde die genaue Masse des Basispeaks aus dem von X erhaltenen Massenspektrum mit m/e = 112,0729 bestimmt, die der des Basispeaks aus dem Spektrum von OCAMP gleicht und mit dem zugeordneten Fragment $C_6H_{10}NO$ übereinstimmt (errechnet: 112,0762; s. Tab.3).

Mit dem Massenspektrometer AEI MS9 (2.8.2.2.) war die Registrierung hochaufgelöster Spektren möglich. Der gereinigte Metabolit X (0,05 µmol) wurde in der Sonde eingedampft; nach Einführen der Sonde wurden durch langsames Aufheizen der Quelle Verunreinigungen und Lösungsmittelrückstände in der Probe abdestilliert (PROX et al.,1973). Bei 140°C Quellentemperatur wurde ein hochaufgelöstes Spektrum aufgenommen. Der höchste Chlor enthaltende Peak (m/e = 319) wurde wegen geringer Intensität nicht vom Speicher des Datensystems erfaßt; für weitere Peaks gibt Tab. 6 die errechneten Summenformeln wieder.

m/e	Summenformel	Abweichung von der Theorie ($m/e \cdot 10^{-3}$)
301.1482	$C_{18}H_{22}N_2Cl$	1.1
244.0899	$C_{15}H_{15}NCl$	0.7
193.1334	$C_{11}H_{17}N_2O$	-0.6
168.0580	$C_9H_{11}NCl$	0.1
167.0629	$C_{10}H_{12}Cl$	0.2
135.0926	$C_8H_{11}N_2$	0.5

Tabelle 6: Hochaufgelöste Massenspektrometrie von Metabolit X aus Rattenurin. AEI MS9 (2.8.2.2.), 140°C Quellentemperatur.

3.1.2.8. Infrarot- und Ultraviolett-Spektroskopie von X

Mit der in 2.10.1 angegebenen Anordnung konnte mit ungefähr 5/umol X, bestimmt aus der spezifischen Radioaktivität, kein zufriedenstellendes IR-Spektrum registriert werden. Bei einer Wellenlänge von 4200 bis 4400/um war eine breite Bande zu sehen, eine scharfe bei 10750/um. Dem erhaltenen Spektrum wird weitere Aussagekraft genommen durch die Beobachtung, daß nach Elution der Radioaktivität aus der KBr-Scheibe in dem Eluat dünnschichtchromatographisch Zersetzungsprodukte nachweisbar waren.

Ebenso lieferte das UV-Spektrum (2.10.2.) von X in Methanol keine weitere Information (Abb. 13); vergleiche hierzu das UV-Spektrum von CP (Abb. 14).

3.1.2.9. Anorganisches Phosphat

Es wurde spekuliert, daß der Metabolit X anorganisches Phosphat enthalten könnte, das vielleicht mit der Enol-Form von OCAMP verestert vorliegen könnte; dadurch wäre sowohl die Labilität der Verbindung als auch die geringe Flüchtigkeit in der GLC und beim MS erklärlich. 0,5/umol X wurden mit Perchlorsäure (0,5 ml) gekocht und anschliessend auf äquimolare Mengen von Phosphat mit der colorimetrischen Methode unter Verwendung von Ammoniummolybdat untersucht (Merckotest, E. Merck), wobei kein Phosphat gefunden wurde.

3.1.2.10. Kernresonanz-Spektrometrie (NMR)

Das NMR bietet die Möglichkeit einer nicht destruktiven Strukturaufklärung (2.9.). Alle Spektren wurden bei Zimmertemperatur in Lösungsmittel CD_3OD als 90 MHz Fourier-NMR aufgenommen. Günstigere Lösungsmittel konnten nicht verwendet werden, da sie entweder zu wenig polar waren ($CDCl_3$) oder die gelösten Substanzen offensichtlich veränderten (D_6-DMSO).

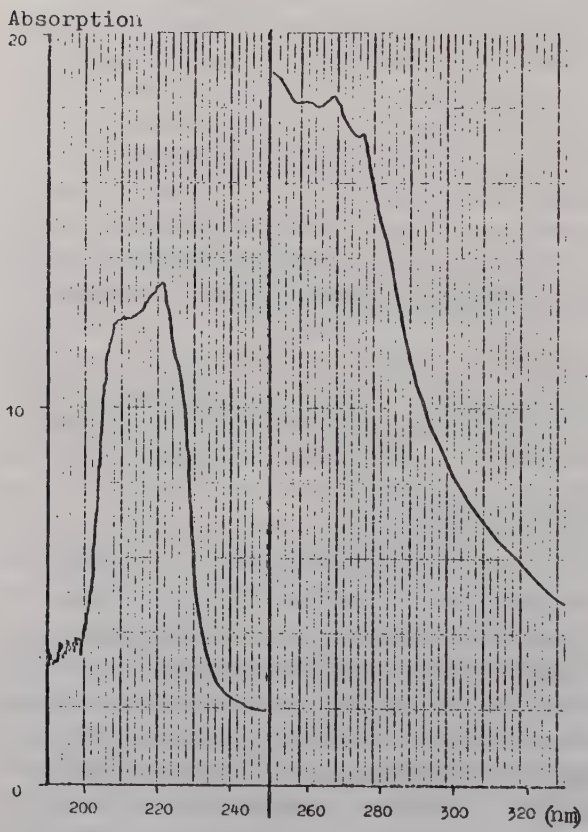


Abbildung 13: UV-Spektrometrie von Metabolit X aus Rattenurin. Lösungsmittel: Methanol; Konzentration: c.a. 1 mM; Referenz: Methanol.

Als Vergleichsspektren dienten solche von CP (0,17 %ige Lösung, 1024 Pulse) und von unverändert ausgeschiedenem CP (0.05 %ige Lösung, 1024 Pulse), welches parallel zum Metaboliten X isoliert worden war (3.1.3.2.). Neben den

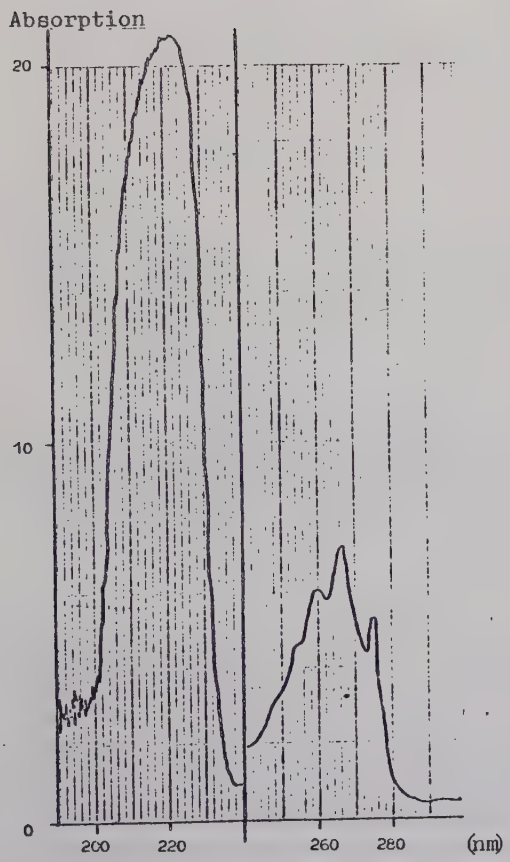


Abbildung 14: UV-Spektrometrie von CP. Lösungsmittel: Methanol; Konzentration: 1 mM; Referenz: Methanol.

Lösungsmittelbanden fanden sich folgende Signale:

ppm	Anzahl der Protonen	Postulierte Herkunft
1.29 (Singulett)	6	2 X $-CH_3$
2.89 (")	2	1 X $-CH_2-$
7.30 (Quartett)	4	p-chloro-benzyl-

Im Spektrum von unverändert ausgeschiedenem, aus dem Urin isoliertem CP erschienen zusätzliche Signale, die auf Verunreinigungen zurückgeführt wurden:

1.9	(Singulett)	c.a. 20	Azetat
2.9.	(")	<1	unbekannt
3.6.	(")	c.a. 1	"

Eine c.a. 0,05%ige Lösung des Metaboliten X ergab folgende Signale (Lösungsmittelsignale gelöscht; 15250 Pulse) :

1.26 1.28 1.32	(Triplett?)	9 12 7	2 X $-CH_3$ + ?
1.90	(Singulett)	c.a.35	Azetat
2.88	(")	2	$-CH_2-$
3.02	(")	2	unbekannt
3.05	(")	4	"
4.02	(")	1	"
4.25	(")	2	"
4.44	(")	4	"
7.31	(Quartett, nicht aufgelöst)	19	p-chloro-benzyl- und Benzol

Diese Daten geben keine weiteren Aufschlüsse über die Struktur von X; insbesondere enthalten sie keinen Hinweis über die Natur der Bindung zwischen CP und dem in Säure abspaltbaren Molekülrest. Mit einer gewissen Sicherheit kann aus dem Signal bei 7.31 ppm geschlossen werden, daß der abspaltbare Molekülrest über die Aminogruppe und nicht über das aromatische System von CP gebunden wird.

3.2. Quantifizierung der Metabolite

3.2.1. Unverändertes CP

Unverändert ausgeschiedenes ^{14}C-CP wurde mittels umgekehrter Isotopenverdünnung wie unter 2.4.4. in den Urinproben bestimmt.

3.2.2. N-oxidierte Metabolite

Da die Lösungsmittelextraktion aus Urin bei neutralem pH (2.6.2.) offensichtlich spezifisch und quantitativ in Bezug auf die radioaktiven N-oxidierten Metabolite war, diente diese auch zur Quantifizierung bei allen untersuchten Arten. Teilweise nach vorausgehender Inkubation mit β-Glucuronidase oder Sulphatase (2.5.1. und 2.5.2.) wurde extrahiert und in beiden Phasen die Radioaktivität bestimmt. Wurde nach Silylierung (2.7.4.1.) in der organischen Phase gaschromatographisch (3.1.1.1.) neben CP-NHOH auch $CP-NO_2$ festgestellt, so wurde 200-300 µl unbehandelter Urin, der ungefähr 0,01 µCi enthielt, nach 2.7.1. in Fließmittel D dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und nach 2.4.2. ausgewertet. Eine Empfindlichkeit für weniger als 10 µg/ml $CP-NO_2$ konnte gezeigt werden. Die Menge an ausgeschiedenem CP-NHOH ergab sich dann aus der Gesamtaktivität neutralextrahierbarer Aktivität abzüglich des auf DC bestimmten Anteils an $CP-NO_2$.
Bei den Untersuchungen am Menschen war die spezifische Aktivität des Urins infolge der kleineren Dosen (c.a. 1 mg/kg CP gegenüber 15 und 100 mg/kg bei den Tierversuchen) sehr viel niedriger. Deshalb mußte hier die Quantifizierungsmethode verändert werden. Urinproben (20 ml) wurden zur Konzentrierung ohne Vorbehandlung oder nach vorausgehender Inkubation mit β-Glucuronidase (2.5.1.) oder Sulphatase (2.5.2.) mit XAD-2 (2.6.1.) extrahiert. Das methanolische Eluat wurde unter Vakuum eingeengt und in einem Stickstoffstrom das Lösungsmittel bis zur Trockne entfernt. Der Rückstand wurde in 250 µl Methanol aufgenommen und je 100 µl des Konzentrats in Fließmittel C und D (2.7.1.) dünnschichtchromatographisch nach 2.4.2. quantifiziert. Nach Entwicklung in D befand sich der größte Teil der Radioaktivität am Start, ein kleiner Peak bei R_f= 0,73 entsprach $CP-NO_2$. Chromatogramme in Fließmittel C zeigten Peaks bei R_f=0,30, 0,34 und 0,80 - von letzterem

war ein kleinerer Radioaktivitätspeak bei R_f=0,91 nicht immer aufgelöst. Da Urinproben nach Inkubation mit β-Glucuronidase den Peak bei R_f=0.30 nicht enthielten und der Peak bei R_f=0,80 sich entsprechend vergrößerte, wurde geschlossen, daß R_f=0,30 dem NO-Glucuronid von CP-NHOH entspricht.

3.2.3. Metabolit X

Wie oben beschrieben (3.1.2.), setzt saure Hydrolyse (2.5.3.) aus dem Metaboliten X CP frei. Da dieses mittels Isotopenverdünnung (2.4.4.) erfaßbar ist, wurde X in Urinproben aus der Differenz zwischen freiem ^{14}C-CP und Gesamt-^{14}C-CP nach saurer Hydrolyse bestimmt (2.4.4.).

3.3. Metabolismus von ^{14}C-Chlorphentermin in sechs Spezies

Tab. 7 gibt die Ausscheidung von ^{14}C nach einer einmaligen Gabe von ^{14}C-CP in den untersuchten Arten wieder. Die vergleichsweise schnelle Exkretion bei den beiden Affenarten mag teilweise auf die im-Applikation zurückzuführen sein. Der Umfang der Metabolisierung ist in Tab. 8 zusammengefaßt. Ganz allgemein war die fäkale Elimination von ^{14}C bei allen Arten vernachlässigbar gering. Bei den Untersuchungen am Menschen waren keine Fäces gesammelt worden, und beim Meerschweinchen war wegen auftretender Chemoluminiszenz (2.4.3.) nur die Aussage zu treffen, daß weniger als 3% der verabfolgten Aktivität fäkal ausgeschieden wurde.

3.3.1. Metabolismus von ^{14}C-CP bei Ratte, Meerschweinchen und Kaninchen

Einmalige Dosen von 100mg/kg ^{14}C-CP po wurden an 3 Ratten, 3 Meerschweinchen und 3 Kaninchen verabreicht, außerdem an 3 Ratten 10 mg/kg ^{14}C-CP po. Diese üblichen Labortiere zeigten sehr unterschiedliches Stoffwechselverhalten. Bei

Art Anzahl, Geschlecht	Ratte 3,♀	Ratte 3,♀	Meerschw. 3,♀	Kanin. 3,♀	Rhesus 2,♀	Tamarin 1,♂	Mensch 2,♂
Dosis (mg/kg)	10po	100po	100po	100po	15im	15im	1 po
Tage n.Applikation							
1	38 (21-50)	12 (5-17)	24 (16-28)	17 (9-30)	83;89	52	22;13
2	23 (19-25)	15 (12-21)	20 (13-27)	40 (11-51)	40;11	12	19;12
3	14 (12-17)	14 (12-18)	11 (8-13)	26 (1-60)	21;24	7,6	12;10
4	6 (5-8)	10 (7-13)	9 (7-11)	1 (0,3-1,6)	-	-	93;11
5	-	5 (5-6)	7	0,3 (0,1-0,6)	-	-	- ;50
6	-	-	-	-	-	-	- ;62
Summe	83 (71-95)	56 (47-66)	70 (62-77)	84 (79-91)	89;101	71	62;57
^{14}C in Fäces während des Versuchs	2,6 (2,1-2,9)	0,4 (0,3-0,5)	<3	1,0 (0,7-1,2)	0,9;0,1	1.9	-

Tabelle 7: Kumulative Ausscheidung in Urin und Fäces von ^{14}C in % der Dosis nach ^{14}C-CP. Für die Primaten sind Einzelwerte, im übrigen Bereiche () angegeben.

Art Anzahl, Geschlecht	Ratte 3,♀	Ratte 3,♀	Meerschw. 3,♀	Kanin. 3,♀	Rhesus 2,♀	Tamarin 1,♂	Mensch 2,♂
Dosis (mg/kg)	10 po	100po	100po	100po	15 im	15 im	1 po
Tage n.Applikation	2	3	3	3	1	1	3
^{14}C ausgeschieden als:							
Chlorphentermin	46	30	28	12	22	22	23
Unbekannt (X)	16	11	n.e.	34	n.e.	30	n.e.
Hydroxylamin, frei	n.e.	n.e.	14	12	9	n.e.	8
" ,Glucuronid	n.e.	n.e.	13	22	56	n.e.	10
Nitroanalogon($CP-NO_2$)	n.e.	n.e.	n.e.	2,2	n.e.	n.e.	3,2
Summe	62	42	54	83	87	52	44
^{14}C-Gesamtausscheidung	62	42	55	82	86	52	44

Tabelle 8: Metabolitenmuster von Chlorphentermin in verschiedenen Arten in % der applizierten Radioaktivität nach ^{14}C-CP als Mittelwerte.
n.e. = mit der verwendeten Bestimmungsmethode nicht erfaßt.
^{14}C-Gesamtausscheidung im Urin über die Versuchsdauer.

der Ratte war das Ausmaß an Metabolismus gering, wohingegen das Kaninchen die einzige Spezies war, bei der alle in der vorliegenden Arbeit überhaupt festgestellten Metaboliten von CP gefunden wurden.

In Abb. 15 ist die kumulative Ausscheidung von ^{14}C dargestellt. Infolge der geringen Bildung polarer Metabolite scheidet die Ratte bei einer Dosis von 100 mg/kg 50% der applizierten Radioaktivität erst nach 94 h im Urin aus, und die Elimination verläuft über drei Tage linear. Nach einer Dosis von 10 mg/kg ist dies nich zu beobachten, nach 37 h erscheinen 50% ^{14}C im Urin. Dagegen scheidet das Kaninchen 50% einer Dosis von 100 mg/kg ^{14}C-CP in den ersten 48 Stunden nach Applikation aus, zu einem großen Teil erwartungsgemäß als polare Metaboliten (s.u.). Dazwischen ist das Meerschweinchen mit einer Aktivitätsausscheidung im Urin von 50% nach 64 h nach einer Gabe von 100 mg/kg ^{14}C-CP einzuordnen.

Tab. 9 vergleicht den Metabolismus von CP in der Ratte nach unterschiedlichen Dosen. Es wurde kein N-oxidierter Metabolit gefunden, aber neben unverändertem CP wurden 30% der ausgeschiedenen Aktivität als unbekannter Metabolit X bestimmt. Der Metabolitenanteil erscheint dosisunabhängig.

In Tab. 10 sind die Ergebnisse am Meerschweinchen aufgeführt. Neben unverändertem CP wurden große Mengen an freiem und konjugiertem CP-NHOH (26% und 24% der Ausscheidung) gefunden.

Das Kaninchen bildet vier Metaboliten, die neben der unveränderten Verbindung zur Ausscheidung kommen (Tab. 11). 15% der ausgeschiedenen Radioaktivität wurden als unverändertes CP, 41% als Metabolit X, 15% als freies und 27% als glucuronidiertes Hydroxylamin und 2% als CP-NO_2 erfaßt.

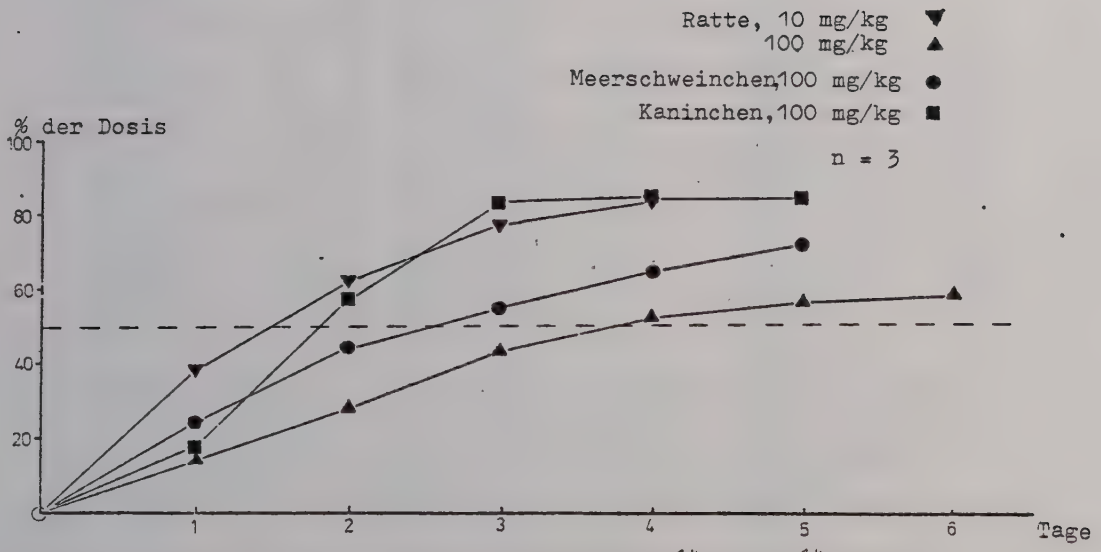


Abbildung 15: Kumulative renale Ausscheidung von ^{14}C nach ^{14}C-CP po

Dosis	10 mg/kg		100 mg/kg		
Tag	1	2	1	2	3
CP	27 (15-36)	19 (15-23)	9 (4-11)	10 (7-14)	12 (9-16)
X	11 (6-19)	5 (2-6)	3 (1-6)	5 (3-7)	3 (2-4)
Summe	38 (21-50)	23 (19-25)	12 (5-17)	15 (12-21)	14 (12-18)
^{14}C-Gesamt-ausscheid.	38 (21-50)	23 (19-25)	12 (5-17)	15 (12-21)	14 (12-18)

Tabelle 9: Metabolismus von ^{14}C-CP nach oraler Dosis von 10 und 100 mg/kg in der Ratte. Ausscheidung in % der applizierten Aktivität als Mittel aus drei Versuchen.

Tag	1	2	3
CP	13 (6-20)	11 (8-17)	3 (3-4)
CP-NHOH, frei	5 (3-7)	6 (2-9)	3 (2-3)
" ,Glucuron.	6 (4-8)	3 (2-5)	4 (1-6)
Summe	24 (15-28)	20 (13-28)	10 (7-13)
^{14}C-Gesamt-ausscheidung	24 (16-28)	20 (13-27)	11 (8-13)

Tabelle 10: Metabolismus von ^{14}C-CP nach oraler Dosis von 100 mg/kg im Meerschweinchen. Ausscheidung in % der applizierten Aktivität als Mittel aus drei Versuchen. Bereiche in ().

Tag	1	2	3
CP	3 (1-4)	7 (3-10)	3 (0,2-6)
CP-NHOH, frei	3 (2-4)	7 (4-8)	2 (0,1-4)
" ,Glucuron.	6 (1-15)	9 (4-11)	7 (0,0-15)
$CP-NO_2$	0,6	1	0,5
X	5 (2-9)	15 (10-23)	14 (0,2-34)
Summe	18 (7-31)	39 (21-46)	26 (0,8-59)
^{14}C-Gesamt-ausscheidung	17 (9-30)	40 (20-51)	26 (0,8-60)

Tabelle 11: Metabolismus von ^{14}C-CP nach oraler Dosis von 100 mg/kg im Kaninchen. Ausscheidung in % der applizierten Radioaktivität als Mittel aus drei Versuchen mit denBereichen in ().

3.3.2. Metabolismus von Chlorphentermin in den Primaten

Eine einmalige Dosis von 15 mg/kg ^{14}C-CP wurde einem männlichen Tamarinaffen und zwei weiblichen Rhesusaffen verabreicht. Zwei freiwillige männliche Versuchspersonen nahmen einmal 65 mg ^{14}C-CP ein, entsprechend etwa 1mg/kg. In Abb. 16 ist der Verlauf der Aktivitätsausscheidung bei diesen Versuchen dargestellt; ein direkter Vergleich der Spezies ist wegen der unterschiedlichen Art und Höhe der Dosierung jedoch nicht möglich.

In Tab. 12 sind die Einzelergebnisse aus den Versuchen mit Affen aufgeführt. Nur die ersten 24 h nach der Dosierung wurden auf Urinmetaboliten untersucht, da die ^{14}C-Exkretion sehr schnell verlief und an den folgenden Tagen die spezi-

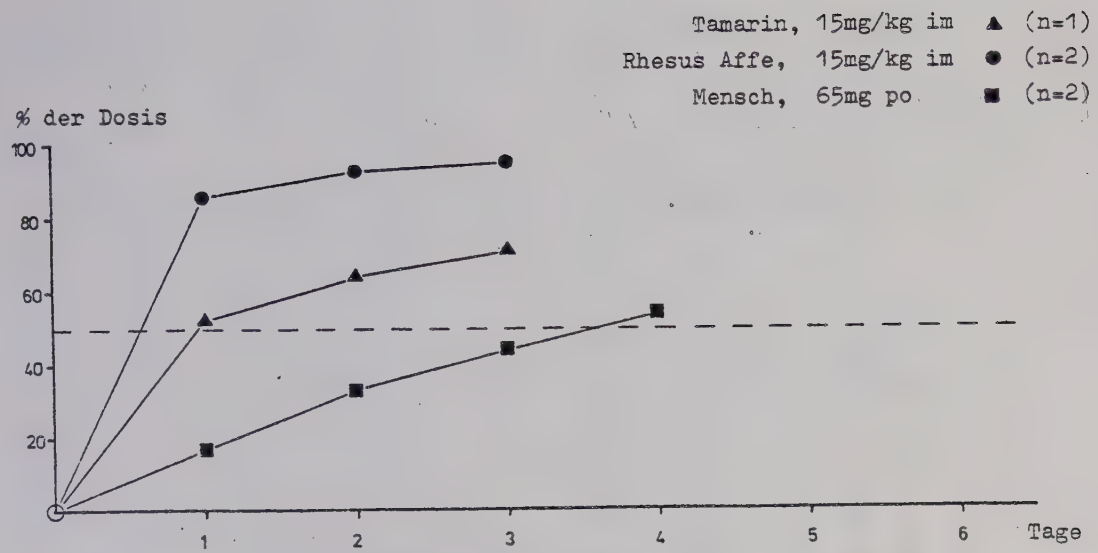


Abbildung 16: Kumulative renale Ausscheidung von ^{14}C nach ^{14}C-CP

Art Anzahl	Rhesusaffe 2	Tamarin 1
CP	22 (21,23)	22
CP-NHOH, frei	9 (8,10)	n.e.
" ,Glucuron.	56 (65,47)	n.e.
X	n.e.	30
Summe	87 (94,80)	52
^{14}C-Gesamt-ausscheidung	86 (89,83)	52

Tabelle 12: Metabolismus von ^{14}C-CP nach einmal 15 mg/kg im in zwei Affenarten. Ausscheidung in % der applizierten Radioaktivität als Mittel mit den Einzelwerten in () oder als Einzelwerte. n.e. = nicht erfaßt.

fische Aktivität der Urinproben entsprechend sehr niedrig war. Die Stoffwechselwege von CP unterscheiden sich wesentlich bei diesen Arten, da der Tamarin große Mengen von Metabolit X ausscheidet (30% der Dosis nach 24 h) und N-Oxidation hier nicht festgestellt werden konnte. Insofern ähnelt dieses Tier der Ratte, wogegen der Rhesusaffe am umfangreichsten von allen untersuchten Spezies die N-Oxidation durchführt (65% der Dosis nach 24 h).

Der Metabolismus beim Menschen (Tab.13) ist qualitativ mit dem beim Rhesusaffen gefundenen vergleichbar, doch wird CP in größerem Ausmaß unverändert ausgeschieden (23% der Dosis während der ersten drei Tage); daneben werden CP-NO_2 (3%) sowie freies (8%) und glucuronidiertes (10%)

Tag	1	2	3
CP	8 (10,2;5,6)	10 (11,7;7,3)	6 (5,2;6,5)
CP-NHOH, frei	4 (4,8;2,5)	3 (3,5;1,6)	1 (1,5;0,9)
" ,Glucuron.	5 (5,8;3,3)	3 (3,3;2,5)	2 (3,1;1,6)
CP-NO_2	1 (1,2;0,9)	0,7 (0,7;0,7)	1 (1,6;1,4)
Summe	17 (22,0;12,3)	16 (19,2;12,1)	11 (11,4;10,4)
^{14}C-Gesamt-ausscheidung	17 (22,3;12,5)	16 (18,5;12,3)	11 (11,6;10,4)

Tabelle 13: Metabolismus von ^{14}C-CP nach einmal 65 mg po beim Menschen. Ausscheidung in % der applizierten Aktivität als Mittel aus zwei Versuchen mit den Einzelwerten in ().

CP-NHOH festgestellt. Wiederum ist die geringe Metabolisierung zu polaren Metaboliten gefolgt von erst 50% der ^{14}C- Ausscheidung im Urin nach 72 h und 120 h bei den beiden Probanden. Obwohl die Eliminationsgeschwindigkeit bei den beiden Versuchspersonen sehr verschieden war, weichen die Anteile der Metabolite an der Gesamtausscheidung nicht wesentlich voneinander ab.

4. Diskussion

4.1. N-Oxidation

Die in der Einleitung ausgesprochene Erwartung, Chlorphentermin könnte von seiner Struktur her eine isolierte Studie der metabolischen Veränderungen einer primären aliphatischen Aminogruppe ermöglichen, erwies sich als richtig. Die Summe der im Urin ausgeschiedenen Metaboliten und des unveränderten CP stimmt in allen untersuchten Arten weitgehend mit Gesamtradioaktivität des Urins überein, so daß praktisch alle bedeutenden Metaboliten erfaßt wurden, und unter diesen ist der Anteil an N-oxidierten CP-Derivaten bei einigen Spezies erheblich.
Dies erscheint zunächst im Widerspruch zu früheren Untersuchungen, die der N-Oxidation aliphatischer Amine keine größere Bedeutung in vivo zumaßen (LINDEKE et al.,1973), findet aber gute Übereinstimmung mit in vitro erarbeiteten Ergebnissen an Mikrosomenpräparationen, die in der oben (1.) erwähnten Übersicht von GORROD (1973) zusammengefaßt sind. So teilen BECKETT und AL-SARRAJ 1972 mit, daß die N-oxidierende Aktivität von 10 000g-Mikrosomenpräparationen aus Meerschweinchenleber etwa einhundertfach größer sei als die entsprechender Rattenleberpräparationen; tatsächlich zeigte sich in der vorliegenden Untersuchung, daß die Ratte im Gegensatz zum Meerschweinchen keine N-oxidierten CP-Metabolite ausscheidet. Geringe Mengen von CP-NHOH mögen von der Ratte vielleicht gebildet werden, jedoch konnten CHO und Mitarbeiter (1974) dessen schnelle Reduktion in vivo demonstrieren.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen an der Primatengruppe dürften deshalb von besonderem Interesse sein, weil die aliphatische N-Oxidation bei diesen Spezies bisher nicht untersucht wurde. Überraschend ist der erhebliche Unterschied zwischen dem Tamarin, einem Neuweltaffen, der in Bezug auf das Metabolitenmuster der Ratte

ähnelt, und dem Rhesusaffen als Vertreter der Altweltaffen, der dem Menschen wenigstens bezüglich der Qualität, nicht jedoch bezüglich der relativen Verteilung der Metaboliten im Urin nahesteht. Somit können Ratte und Tamarin als Beispiel gelten für Arten mit einem isolierten Enzymdefekt in der Oxidation aliphatischer Amine.

Dem Nitro-Analogon von CP, welches bei Kaninchen und beim Menschen als Nebenmetabolit gefunden wurde, sollte nur mit Zurückhaltung systemische Bedeutung beigemessen werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß CP-NO_2 unter den Bedingungen der ableitenden Harnwege spontan aus CP-NHOH entsteht.

BECKETT und BELANGER (1974a) fanden nach Verabreichung von CP mit einer GLC-MS-Methode ähnlich der hier benützten CP-NHOH, CP-NO_2 und außerdem das Nitroso-Analogon von CP in menschlichem Urin, jedoch wurde keine quantitative Bestimmung durchgeführt. Wir selbst konnten mit unserer Methode das Nitroso-Analogon nicht feststellen, es verblieb bei der Chromatographie jedoch kein unbekannter Peak, der nicht auch im Urin unbehandelter Tiere zu finden und deshalb einem unbekannten zusätzlichen Metaboliten zuzuordnen wäre.

4.2. Metabolit X

Auch wenn die vorliegenden Untersuchungen zunächst die Bedeutung der N-Oxidation alphatischer Amine *in vivo* klären wollte, mußten doch auch andere Stoffwechselwege von CP zur Vollständigkeit abgeklärt werden; deshalb nahm der Versuch einer Strukturaufklärung des von Ratte, Kaninchen und Tamarin gebildeten Metaboliten X breiten Raum ein, besonders weil wahrscheinlich erschien, daß eine Reaktion der Aminogruppe zugrunde liegt, welche womöglich auch für andere Amine von Bedeutung sein könnte (s.u.). Daß es sich

bei X um ein Konjugat ausgehend von unverändertem CP handeln müsse, wurde aus der beobachteten Säurelabilität geschlossen. DUBNICK et al. (1968) beschrieben bereits bei der Papierchromatographie von Urin von mit ^{14}C-CP behandelten Ratten in Fließmittel A einen Radioaktivitätspeak mit R_f=0,69; dieser Peak verschwand zugunsten von CP, wenn der Urin zuvor mit Säure hydrolysiert worden war. Isolationsversuche scheiterten an der Labilität des Metaboliten bei der Lösungsmittelextraktion. Diese Autoren beschrieben den Metaboliten auch für die Maus.

In der vorliegenden Arbeit gelang zwar die Isolation von X mittels Extraktion auf XAD-2, doch scheiterten die Identifikation wieder an der Labilität des Metaboliten.

Die Farbreaktionen von X in der DC sind wenig aussagekräftig ; X reagiert nicht mit dem für Amide spezifischen Stärke/KJ - Reagenz, dagegen ist die Reaktion positiv mit BKG und DMAC wie bei CP selbst, außerdem mit TTZ (Reduktion), Ninhydrin und DNPH (Ketogruppen). Die Ninhydrinreaktion könnte einen Hinweis auf eine freie Aminogruppe geben, doch ist der Nachweis nicht sehr spezifisch (McCALDIN, 1960); zudem handelt es sich möglicherweise um die durch Hydrolyse freigesetzte Aminofunktion von CP selbst. Der gleiche Einwand gilt für das sauer eingestellte DNPH-Reagenz, welches mit einer freien Ketogruppe oder einer nach Hydrolyse freigesetzten Ketogruppe des abspaltbaren Molekülrestes reagieren kann. Wenn es möglich wäre, die Entstehung des inaktiven, Ninhydrin- und DNPH-positiven Fleckes in der DC bei R_{fZ}=0,23 aus X einwandfrei nachzuweisen (3.1.3.3.) und das Phenylhydrazon dieser Verbindung mit GLC und MS zu untersuchen, könnte vielleicht ein Hinweis zur Struktur des abspaltbaren Molekulanteils von X erbracht werden.

Mittels GLC-MS konnten insgesamt 15 thermische Zerfallsprodukte des Metaboliten X nachgewiesen werden (Abb. 12), von denen das nach CP mengenmäßig bedeutenste als OCAMP, eine Schiff'sche Base, identifiziert wurde. Da die drei schwersten Zerfallsprodukte zwei Chloratome in ihren Spektren enthalten und somit aus zwei Molekülen CP entstanden sein müssen, erscheint es unwahrscheinlich, daß alle beobachteten Chlorverbindungen aus der schwersten im Gaschromatogramm oder einer darin nicht enthaltenen noch schwereren als Artefakte entstanden sind; dies setzte eine metabolische Dimerisation zweier CP-Metabolite voraus, wofür die Konzentration von CP im biologischen System mit Sicherheit zu niedrig ist. Weitere Aufschlüsse erbrachte auch nicht die hochauflösende Massenspektrometrie, da die Summenformel $C_{18}H_{22}N_2Cl$ (m/e=301) keinem stabilen Molekülion zugeordnet werden kann (Stickstoffregel). Auch wenn man dem nicht analysierten Peak mit m/e=319 die gleiche Summenformel unter Zugabe von H_2O zuschriebe, wäre damit das Molekülion aus dem gleichen Grund nicht erreicht; die primäre Abspaltung eines Methylradikals wäre freilich aus Analogie zur Massenspektrometrie der Ausgangsverbindung und anderer CP- (s.2.2.) und Amphetamin-Derivate zu erwarten (REISCH et al., 1968). Die Ionen für m/e=301 und m/e=244 aus dem hochaufgelösten Spektrum finden sich auch im Massenspektrum des am längsten retinierten Peaks (T_R=29,5 min) aus der GLC-MS mit chemischer Ionisation. Der Molekülpeak ist hierzu M+1= 427. Da die Differenz von 301 zum Molekülion M=426 der Masse des Chlorotropyllium, dem stabilsten Fragment aus dem Spektrum von CP, entspricht, liegt es nahe, dieses Fragment der Massendifferenz zugrunde zu legen. Dann wäre die Summenformel zu M=426 $C_{25}H_{28}N_2Cl_2$; das Molekül enthielte zweimal Chlorphentermin ($C_{10}H_{14}NCl$), verbunden durch einen C_5-Körper mit einer unbekannten Zahl von Doppelbindungsäquivalenten, abhängig von der Art der Bindung

der CP-Moleküle an das Restmolekül. Da es sich bei diesem Molekül jedoch sicherlich um ein Artefakt handelt, wie oben bereits ausgeführt wurde, sind solche Überlegungen zur Struktur von geringem Wert.

Aus den Ergebnissen der NMR-Untersuchungen kann geschlossen werden, daß sowohl das aromatische System wie auch die beiden Methylgruppen von CP in X unverändert vorliegen, über das restliche Molekül sind keine Schlüsse möglich. Immerhin ist damit nochmals die Richtigkeit der Auswahl von CP als eine Modellverbindung für die Metabolisierung der aliphatischen Aminogruppe bestätigt.

Man könnte annehmen, der Metabolit X sei eine Schiff'sche Base wie das identifizierte Zerfallsprodukt OCAMP. Es ergibt sich dann die Möglichkeit, einen weiteren Weg der oxidativen Desaminierung der Amphetamine zu postulieren. In Abb. 17 ist ein ähnlicher Reaktionsweg für Amphetamin über eine intermediäre Schiff'sche Base, Verschiebung der Doppelbindung durch Tautomerisation und eine Hydrolyse angedeutet, wie er für die Desaminierung von Aminosäuren mittels Pyridoxalphosphat bekannt ist (MAHLER und CORDES, 1971), und wie er kürzlich für Dopa gezeigt wurde (O'LEARY et al.,1975). Hierbei entstünde schließlich Phenylazeton, und der aufgezeichnete Stoffwechselweg könnte einen Teil jener 70% von Phenylazeton liefern, das aus Amphetamin bei in vitro Untersuchungen mit schweren Isotopen von PARLI und McMAHON (1973) gebildet wurde und keinen molekularen $^{18}O_2$ inkorporierte. Für CP würde dieser Abbauweg nach der ersten Stufe blockiert sein, da die Tautomerisierung durch die zweite α-Methylgruppe verhindert und dies Zwischenprodukt stabilisiert wird. Dieses Zwischenprodukt oder ein Metabolit daraus könnte als X zur Ausscheidung gelangen. Zum gegenwärtigen Zeit ist diese Überlegung freilich spekulativ; möglicherweise könnten in vitro-

Untersuchungen hier Aufschluß geben.

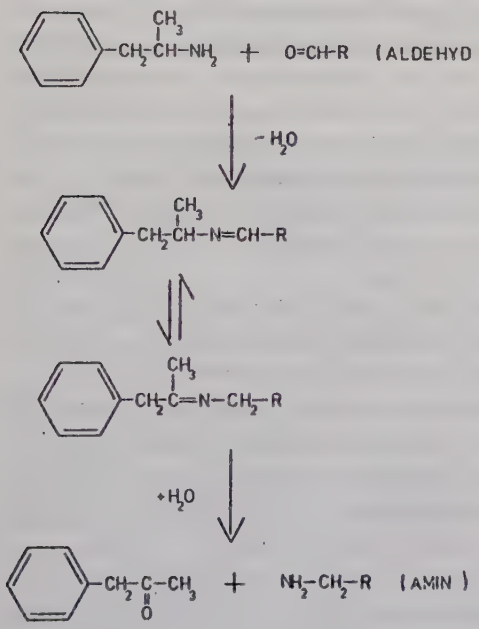


Abbildung 17: Postulierte Deamination von Amphetamin über eine intermediäre Schiff'sche Base.

4.3. Unverändert ausgeschiedenes Chlorphentermin und Phosphplipidose

Bei allen untersuchten Arten stellt unverändert ausgeschiedenes CP einen wesentlichen Anteil an der Gesamtelimination der Verbindung. Wie schon eingangs erwähnt (3.3.), scheint das Ausmaß an Metabolismus direkt mit der Eliminationsgeschwindigkeit zu korrelieren, was vermutlich auf die die stark lipophilen Eigenschaften der unveränderten Substanz zurückzuführen ist. Eine verzögerte Ausscheidung und Kumulation ist für die histopathologischen Effekte von CP bedeutsam (LÜLLMANN et al., 1973), welche

zuerst in der Lunge beobachtet wurden, als der in der Einleitung (1.) erwähnte Lungenhochdruck untersucht wurde (LÜLLMANN-RAUCH et al., 1972). Große Makrophagen, sogenannte Schaumzellen, wurden in den Lungenalveolen gefunden, welche bei elektronenmikroskopischer Betrachtung lamelläre Einschlußkörper einer Periodizität von 45-50 Å enthielten. Diese Lamellen sollen aus Phospholipiden bestehen, und isolierte Makrophagen von CP-behandelten Tieren enthielten tatsächlich zehnmal mehr Lipide als solche von Kontrolltieren; zugleich wurde in ihnen ^{14}C-CP gespeichert (SCHMIEN et al., 1974).

Diese arzneimittelinduzierte Phospholipidose hat keinen Bezug zu der auftretenden pulmonalen Hypertension, da sie nicht bei anderen, Lungenhochdruck erzeugenden Verbindungen wie Crotolaria Spectabilis oder Aminorex beobachtet wird und auch nicht auf die Makrophagen beschränkt ist; sie wurde vielmehr in all jenen Geweben gefunden, die grössere Mengen an Phospholipiden enthalten (PAWARESCH et al., 1973). Ebendort konnte auch die Retention von ^{14}C-CP durch Autoradiographie demonstriert werden (SEILER et al., 1974). NMR-Studien wurden in vitro über die Interaktionen zwischen dem Pharmakon und Phospholipiden durchgeführt und wiesen deutlich auf intermolekulare Bindungen hin (SEYDEL, 1973); es kann vermutet werden, daß CP an Phospholipide durch seine elektrochemische Ähnlichkeit bindet, da es mit der Aminogruppe ein hydrophiles und mit seiner p-chlorophenyl-Gruppe ein lipophiles Zentrum besitzt. Auch von einigen anderen Substanzen wurde eine Phospholipidose berichtet, und sie alle haben diese amphiphile Struktur gemein (LÜLLMANN et al., 1973).

Die Speziesunterschiede in der CP-induzierten Phospholipidose wurden durch PAWARESCH und Mitarbeiter (1973) dargestellt und scheinen mit der vorliegenden Arbeit in Be-

ziehung zu stehen. Tab. 14 faßt die histopathologischen Befunde der genannten Arbeit nach einer Behandlung über 4-12 Wochen mit 50-100 mg/kg CP täglich in einem halbquantitativen Schema zusammen. Es besteht ein deutlicher Unterschied zwischen der Leberschädigung - am niedrigsten bei der Ratte - und der Veränderung anderer Gewebe, welche bei der Ratte am umfangreichsten ist. Auch LÜLLMANN-RAUCH et al. (1973) beobachten in einer vergleichenden Studie über CP-ausgelöste Leberschäden unbedeutende Veränderungen bei der Ratte, wohingegen die Leberzellen von Meerschweinchen, Mäusen und Kaninchen Einschlußkörper enthielten; diese wurden auch in den Kupferzellen aller vier Arten einschließlich der Ratte gefunden, wo ein Speziesunterschied fehlte.

Man könnte deshalb zwei unabhängige pathogene Mechanismen annehmen und die Ergebnisse von PAWARESCH und Mitarbetern (1973) mit den vorliegenden verknüpfen (Tab. 15). Die sytemische, extrahepatische Schädigung erscheint in Korrelation zu unverändertem CP, da sie bei allen Spezies beschrieben wird, die eine lange Retention der Radioaktivität aufweisen und große Mengen von CP unverändert ausscheiden. Andererseits wurde die Schädigung der Leber-

Versuchstiere	Lunge	Leber	Milz	Nebenniere
Ratte	+++++	+	++++	++++
Meerschweinchen	++++	+++++	+++	+++
Maus	++	++	+++	+
Kaninchen	+	+	+	++

Tabelle 14: Vergleichende semiquantitative Darstellung über das Ausmaß der Organveränderungen bei verschiedenen Species nach Chlorphenterminbehandlung. Aus: PAWARESCH et al., 1973.

	Metabolismus (einmalig 100 mg/kg ^{14}C-CP)			Pathologie ([1]) (chron. 50mg/kg)	
Art	50% ^{14}C Aussch. nach	% der Dosis ausgeschieden innerhalb von 72 h unverändert	N-oxidiert	System-Schaden	Leber-Schaden
Ratte	94 h	30	n.e.	++++	+
Meerschw.	64 h	28	27	+++	++++
Kaninchen	44h	12	36	+	+

Tabelle 15: Korrelation zwischen histopathologischen Veränderungen und den Unterschieden im Metabolismus nach Applikation von Chlorphentermin. n.e.= nicht erfaßt. ([1]): Nach PAWARESCH et al., 1973.

parenchymzellen bei jenen Spezies gefunden, welche CP auch N-oxidieren; so wurden etwa beim Meerschweinchen die erheblichsten Veränderungen der Leberzellen festgestellt, wobei diese Art besonders umfangreich N-oxidiert. Das Kaninchen scheint zunächst die Korrelation nicht zu bestätigen, doch metabolisiert und eliminiert dieses Tier CP extrem schnell, was eine Erklärung für die geringe Schädigung auch nach 12 Wochen chronischer Behandlung liefern könnte. Kupferzellen haben - anders als die Leberparenchymzellen - eine Phagozytose-Fähigkeit wie die Alveolarmakrophagen und zeigen folglich ebenso eine Schädigung, die nicht auf N-Oxidationsmetabolite von CP zu beziehen ist.

Freilich ist die Pathomorphologie beider Gruppen ultrastrukturell offensichtlich identisch, da die für Phospholipide typischen lamellären und kristallinen periodischen Strukturen von den genannten Autoren sowohl in den Leberzellen als auch in den anderen untersuchten Geweben gesehen wurden. Möglicherweise spielen Permeationscharakteristika der Leberzellmembran eine Rolle bei der Phospholipidose durch CP-NHOH und CP-NO_2; doch kann auf

einen wirklich verschiedenen pathogenetischen Mechanismus durch N-Oxidationsprodukte und durch das unveränderte Amin nicht geschlossen werden. Eine andere Gewebsreaktion auf CP in chronischer Dosis, die von LÜLLMANN-RAUCH und Mitarbeitern (1973) beschriebene Nekrose und Zirrhose der Leber, ist wohl eine Sekundärreaktion dieses empfindlichen und stoffwechselaktiven Gewebes. Die Histologie nach Applikation der einzelnen Metabolite wäre hierzu aufschlußreich.

4.4. Speziesunterschiede im Metabolismus eines primären aliphatischen Amins

Untersuchungen über Speziesunterschiede im Metabolismus einer Verbindung sollen eine Voraussagemöglichkeit über den Stoffwechsel im Menschen schaffen. Deshalb enttäuscht im Falle von CP und womöglich auch anderer primärer Amine, daß keines von fünf verfügbaren Labortieren ein Modell für die Untersuchungen am Menschen liefert. Ratte und Tamarinaffe unterscheiden sich grundlegend im Metabolitenmuster vom Menschen, das Kaninchen bietet dagegen jeden der überhaupt gefundenen Metaboliten. Meerschweinchen und Rhesusaffe kein CP-NO_2, doch N-oxidieren diese Arten ganz erheblich umfangreicher als der Mensch. Somit kann die N-Oxidation eines primären aliphatischen Amins wohl durch Metabolismusstudien an Kaninchen, Meerschweinchen und Rhesusaffen dargestellt werden, doch ist daraus keine sichere Voraussage für den menschlichen Stoffwechsel der Verbindung abzuleiten.

5. Zusammenfassung

In den Spezies Mensch, Rhesusaffe, Tamarinaffe, Kaninchen, Meerschweinchen und Ratte wurde der Stoffwechsel von Chlorphentermin (CP) in vivo untersucht. Neben unverändertem CP wurden als Urinmetabolite N-Hydroxychlorphentermin (CP-NHOH) sowie dessen NO-Glucuronid und 1-(4'-chlorphenyl)-2-methyl-2-Nitropropan ($CP-NO_2$) identifiziert und quantifiziert; außerdem wurde ein labiles, nicht identifiziertes Konjugat von CP gemessen.

1. Es konnte gezeigt werden, daß nur die Aminogruppe von CP in nennenswertem Umfang metabolisch verändert wird, womit die Modellhaftigkeit von CP für ein primäres aliphatisches Amin bestätigt wird.
2. In Bezug auf ihre Fähigkeit zur N-Oxidation unterscheiden sich die untersuchten Arten erheblich. Meerschweinchen und Kaninchen N-oxidieren in großem Ausmaß, auch beim Rhesusaffen und beim Menschen spielt diese Reaktion eine Rolle; dagegen sind beim Tamarinaffen und bei der Ratte in vivo keine N-Oxidationsprodukte festzustellen.
3. Gerade bei der Ratte und beim Tamarinaffen wird jedoch ein labiles Konjugat von CP ausgeschieden, welches indirekt bestimmt werden kann und in saurem und alkalischem Milieu CP freisetzt. Dieser Metabolit wird außerdem nur noch beim Kaninchen gefunden.
4. Alle untersuchten Spezies scheiden größere Mengen von CP unverändert aus. Unverändert ausgeschiedenes CP steht in direkter Beziehung zur Dauer der Retention von appliziertem ^{14}C-CP.
5. Die Elimination von Radioaktivität durch die Faeces nach Gabe von ^{14}C-CP ist in allen untersuchten Arten gering.
6. Möglicherweise können pathohistologische Speziesunterschiede der Phospholipidose nach CP, wie sie von an-

deren Autoren gesehen wurden, durch Unterschiede im Metabolismus von CP erklärt werden.

7. Ein Tiermodell für den *in vivo* Stoffwechsel von CP im Menschen wurde nicht gefunden.

6. Verzeichnis der Abkürzungen

BKG	Bromkresolgrün
BSA	Bistrimethylsilylazetamid
CP	Chlorphentermin
CP-NHOH	N-Hydroxychlorphentermin
CP-NO_2	1-(4'-chlorphenyl)-2-methyl-2-Nitropropan
DC	Dünnschichtchromatographie
D_3-DMSO	deuteriertes Dimethylsulfoxid
DMAC	Dimethylaminozimtaldehyd
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
GLC	Gas-Flüssigkeits-Chomatographie
GLC-MS	gekoppelte Gaschomatographie - MS
MS	Massenspekrometrie
NMR	Kernresonanzspektrometrie
OCAMP	N-(2"-oxopropyliden)-1-(4'-chlorphenyl)-2-amino-2-Methylpropan
PSC	präparative Schichtchromatographie
TMS-	Trimethylsilyl-
TTZ	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid

7. Literaturverzeichnis

ABOU-EL-MAKAREM, M. M., P.MILLBURN, R.L.SMITH and R.T. WILLIAMS: Biliary Excretion of Foreign Compounds; Benzene and its Derivatives in the Rat
Biochem. J. 105, 1269-1274 (1967)

BRAY, G.A.: A simple efficient Liquid Scintillator for Counting aqueous Solutions in a Liquid Scintillator Counter
Anal. Biochem. 1, 279-285 (1960)

BECKETT, A.H., and S. AL-SARRAJ: The mechanism of oxidation of amphetamine enantiomorphs by liver microsomal preparations from different species
J. Pharm. Pharmacol. 24, 174-176 (1972)

BECKETT, A.H. and P.M. BELANGER: Metabolism of Chlorphentermine and Phentermine to yield Hydroxylamine, C-nitroso- and nitro-compounds
J. Pharm. Pharmacol. 26, 205-206 (1974a)

BECKETT, A.H., and P.M. BELANGER: The mechanism of metabolic N-oxidation of phentermine and chlorphentermine to their hydroxylamino- and nitroso-compounds
J. Pharm. Pharmacol. 26, 558-560 (1974b)

BRODIE, B.B., J.R. GILLETTE and B.N. LA DU: Enzymic Metabolism of Drugs and Other Foreign Compounds
Annu. Rev. Biochem. 27, 427-454 (1958)

BRUCE, R.B. and W.R. MAYNARD jr.: Fenfluramine Metabolism
J. Pharm. Sci. 57, 1173-1176 (1968)

CALDWELL, J., L.G. DRING and R.T. WILLIAMS: Biliary Excretion of Amphetamine and Methamphetamine in the Rat
Biochem. J. 129, 25-29 (1972)

CHO, A.K., B. LINDEKE and C.Y. SUM: The N-Hydroxylation of Phentermine (2-methyl-2-amino-1- phenylpropane) - Properties of the Enzyme System.
Drug Metab. Disp. 2, 1-8 (1974)

DERTINGER, G. und H.SCHOLZ: Spektraldensitometrische Einzeldosisbestimmung von Wirkstoffen in Tabletten und Kapseln
Dtsch. Apoth. Ztg. 113, 1735-1738 (1973)

DRING, L.G., R.L. SMITH and R.T. WILLIAMS: The Metabolic Fate of Amphetamine in Man and other Species
Biochem. J. 116, 425-435 (1970)

DUBNICK, B., C.A. TOWNE, J.M. HARTIGAN and G.E. PHILLIPS: Distribution and Metabolism of Chlorphentermine in Rats and Mice
Biochem. Pharmacol. 17, 1243-1250 (1968)

GAHL, K.: Bericht über die Arbeitstagung "Pulmonale Hypertonie" in Hannover, 20. und 21. Februar 1970
Z. Kreislaufforsch. 59, 757-761 (1970)

GORROD, J.W.: Differentiation of Various Types of Biological Oxidation of Nitrogen in Organic Compounds
Chem-Biol. Interact. 7, 289-303 (1973)

HARLEY-MASON, J. and A.A.P.G. ARCHER: Use of p-Dimethylaminocinnamaldehyde as a Spray Reagent for Indol Derivatives on Paper Chromatograms
Biochem. J. 69, 60P (1958)

HUCKER, H.B., B.M. MICHNIEWICZ and R.E. RHODES: Phenylacetonoxime - An intermediate in the oxidative deamination of amphetamine
Biochem. Pharmacol. 20, 2123-2128 (1971)

JAMES, M.O., R.L. SMITH, R.T. WILLIAMS and M. REIDENBERG: The conjugation of phenylacetic acid in man, sub-human primates and some non-human species
Proc. R. Soc. Lond. B 182, 25 (1972)

KORNBLUM, N., R.J. CLUTTER and W.J. JONES: The Synthesis of Tertiary Nitroparafins
J. Am. Chem. Soc. 78, 4003-4004 (1956)

LINDECKE,B., A.K. CHO, T.L. THOMAS and L. MICHELSON: Microsomal N-hydroxylation of phenylalkylamines

Acta Pharm. Suec. 10, 493-506 (1973)

LÜLLMANN, H., R. LÜLLMANN-RAUCH und O. WASSERMANN: Arzneimittel-induzierte Phospholipidspeicherkrankheit
Dtsch. med. Wschr. 98, 1616-1625 (1973)

LÜLLMANN-RAUCH, R., G.H. REIL, E. ROSSEN and K.U. SEILER: The Ultrastructure of Rat Lung Changes Induced by an Anorectic Drug (Chlorphentermine)
Virchows Arch. B Zellpath. 11,167-181 (1972)

LÜLLMANN-RAUCH, R. and G.H. REIL: Chlorphentermine-Induced Ultrastructural Changes in Liver Tissues of Four Animal Species
Virchows Arch. B Zellpath. 13, 307-320 (1973)

MAHLER, H.R. and E.H. CORDES: Biological Chemistry, 2.Aufl. New York / Evanston / San Francisco / London : Harper & Row Publishers 1971

McCALDIN, O.J.: The Chemistry of Ninhydrin
Chem. Rev. 60, 39-51 (1960)

MEHLITZ, A., K. GIERSCHNER und T. MINAS: Dünnschichtchromatographische Trennung von 2,4-Dinitrophenylhydrazonen.
Chem.-Ztg. 87, 573-606 (1963)

METZ, H.: Dünnschichtchromatographische Schnellanalyse bei enzymatischen Steroid-Umsetzungen
Naturwiss. 48, 569-570 (1961)

MIELKE, H., K.-U. SEILER, U. STUMPF und O. WASSERMANN: Über die Beziehung zwischen dem Serotoninstoffwechsel und der pulmonalen Hypertonie bei Ratten nach Gabe verschiedener Anorektika
Z. Kardiol. 62, 1090-1098 (1973)

MILLBURN, P., R.L. SMITH and R.T. WILLIAMS: Biliary Excretion of Foreign Compounds; biphenyl, stilboestrol and phenolphthalein in the rat: molecular weight, polarity and metabolism as factors in biliary excretion
Biochem. J. 105, 1275-1281 (1967)

MÜLLER, E. und U. HEUSCHKEL: Sekundäre und tertiäre N-Nitroso-Hydroxylaminverbindungen des Dekalins
Z. Naturforsch. 19b, 1021-1026 (1964)

O'LEARY, M., and R.L. BAUGHIN: New pathway for the metabolism of dopa
Nature 253, 52-53 (1975)

PARLI, C.J. and R.E. McMAHON: The Mechanism of Microsomal Deamination: Heavy Isotope Studies
Drug Metab. Disp. 1, 337-341 (1973)

PAWARESCH, M.R., G.H. REIL und K.U. SEILER: Über die Tier- und Organspezifität morphologischer Veränderungen nach chronischer Chlorphentermingabe
Res. exp. Med. 161, 272-288 (1973)

PROX,A., A. ZIMMER and H. MACHLEIDT: Rapid Structure Elucidation of Drug Metabolites by Use of Stable Isotopes
Xenobiotica, 3, 103-112 (1973)

RANDERATH, K.: Dünnschicht-Chromatographie, 2. Aufl.
Weinheim: Verlag Chemie 1965

REISCH, J., R. PAGNUCCO, H. ALFES, N. JANTOS and H. MÖLLMANN: Mass spectra of derivatives of phenylalkylamines
J. Pharm. Pharmacol. 20, 81-86 (1968)

SCHMIEN, R., K.-U. SEILER and O. WASSERMANN: Drug-Induced Phospholipidosis. I. Lipid Composition and Chlorphentermine Content of Rat Lung Tissue and Alveolar Macrophages after Chronic Treatment
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 283, 331-334 (1974)

SEILER, K.U. and O. WASSERMANN: MAO-inhibitory properties of anorectic drugs
J. Pharm. Pharmacol. 25, 576-578 (1973)

SEILER, K.-U.,and O. WASSERMANN: Evidence for an Unusual Distribution of Chlorphentermine in vivo
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 282, 113-122 (1974)

SEYDEL, J.K. and O. WASSERMANN: NMR-Studies on the Molecular Basis of Drug-Induced Phospholipidosis Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 279, 207-210 (1973)

WEINSTOCK, J., S.E. PARKER, G.W. LUCYSZYN and A.P. INTOCCIA: N-(p-chloro-(∝-methylphenacyl)-succinamic acid, a succinic acid conjugate of an ∝-aminoketone The Pharmacol. 11, 240 (1969)

Für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und zahlreiche Anregungen zur Durchführung der vorgelegten Versuche bin ich dem Direktor des Instituts für Toxikologie, Herrn Professor Dr.H. Remmer, zu besonderem Dank verpflichtet.

Herrn Professor R.T. Williams, FRS, und seinen Mitarbeitern danke ich für die Ermöglichung eines Teils der Tierversuche am Biochemistry Department des St. Mary's Hospital Medical School in London und für die intensive wissenschaftliche Betreuung.

Herr Professor Dr. F.W. Koss ermöglichte spektrometrische Messungen zur Strukturaufklärung von Metaboliten in den Forschungslaboratorien der Fa. Dr. Karl Thomae GmbH (Biberach/Riß); ihm und seinen Mitarbeitern und ganz besonders Herrn Priv.-Dozent Dr. A. Prox gilt mein ausdrücklicher Dank.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes danke ich für die Finanzierung des Aufenthaltes am St.Mary's Hospital in London.

Lebenslauf

Am 25. Juli 1951 wurde ich, Ulrich Ernst Georg Köster, als Sohn des Ernst Köster und der Maria Köster, geborene von Vagedes, in Stuttgart geboren.

Von 1958 bis 1962 besuchte ich die Grundschule und dann bis 1963 das humanistische Karls-Gymnasium in Stuttgart, von 1963 bis 1967 die Deutsche Schule in San Sebastián in Spanien. Ich wechselte dann auf das mathematisch-naturwissenschaftliche Kepler-Gymnasium in Tübingen über, wo ich am 12. Juni 1970 die Reifeprüfung ablegte.

Von Oktober 1970 war ich für das Studienfach Physik an der Technischen Universität Stuttgart immatrikuliert, ich begann jedoch schon im Sommersemester 1971 aus persönlichen Gründen mit dem Studium der Medizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen. Am 20. März 1972 legte ich die naturwissenschaftliche und am 6. April 1973 die ärztliche Vorprüfung ab.

Von Oktober 1973 bis Juli 1974 studierte ich an der St. Mary's Hospital Medical School der University of London und kehrte darauf nach Tübingen zurück, wo ich am 22. Februar 1977 die Ärztliche Prüfung ablegte.

Am 16. April 1977 heiratete ich die Diplom-Biochemikerin Dorothea Albrecht.